

*Charakterisierung von Tumor- und Tumor-
assoziierten Zellen aus dem peripheren Blut*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen-Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl. Biol. Kathleen Wagner

geboren am 13.09.1983 in Neuhaus am Rennweg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Claus Liebmann (Jena)
2. Prof. Dr. Andreas Hochhaus (Jena)
3. Prof. Dr. Arndt Hartmann (Erlangen)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.03.2012

„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.“

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929), amerik. Soziologe u. Ökonom

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Krebs im Allgemeinen	5
1.2 Tumoren sind komplexe Gewebe	6
1.2.1 Tumor-assoziierte Fibroblasten (TAFs).....	8
1.2.2 Fibroblasten-assoziierte Marker.....	11
1.3 Metastasierung.....	13
1.4 Zirkulierende Tumorzellen	15
1.5 Brustkrebs	16
1.6 Separationsmethoden.....	19
2 Zielstellung	20
3 Material und Methoden.....	21
3.1 Blutaufarbeitung	21
3.1.1 Prinzip.....	21
3.1.2 Methodik.....	21
3.2 Zellkultur	21
3.2.1 Prinzip.....	21
3.2.2 Methodik.....	22
3.3 Zellzahlbestimmung	22
3.3.1 Prinzip.....	22
3.3.2 Methodik.....	22
3.4 Zellseparation	23
3.4.1 MOFLO™ High Performance Cell Sorter	23
3.4.1.1 Prinzip	23
3.4.1.2 Methodik	23
3.4.2 MACS®	24
3.4.2.1 Prinzip	24
3.4.2.2 Methodik	24

3.4.3	RoboSep®	25
3.4.3.1	Prinzip	25
3.4.3.2	Methodik	26
3.5	FACS (Fluorescence activated cell sorting)	29
3.5.1	Prinzip	29
3.5.2	Methodik	29
3.5.2.1	CD90-Marker Etablierung	29
3.5.2.2	Analyse der Fraktionen nach Moflo- und MACS-Separation.....	30
3.5.2.3	Analyse der Fraktionen nach RoboSep-Separation.....	30
3.5.2.4	CD90/CD31- bzw. CD90/CD34-Doppelbestimmung	30
3.6	Fluoreszenzmikroskopie	31
3.6.1.1	Prinzip	31
3.6.1.2	Methodik	31
3.7	Immunhistochemie	32
3.7.1	Prinzip	32
3.7.2	Methodik	32
3.7.2.1	CD90-Marker Etablierung	32
3.7.2.2	Analyse der Fraktionen nach RoboSep-Separation.....	33
3.7.2.3	CD90-Nachweis an Paraffinmaterial von Primärtumoren	34
3.8	Immunfluoreszenz	35
3.8.1	Prinzip	35
3.8.2	Methodik	35
3.8.2.1	CD90-Marker Etablierung	35
3.8.2.2	Analyse der Fraktionen nach RoboSep-Separation.....	36
3.8.2.3	CD90/CD31- bzw. CD90/CD34-Doppelbestimmung	38
3.8.3	Einzelzell-RT-PCR	39
3.8.3.1	Prinzip	39
3.8.3.2	Methodik	39
3.8.4	Einzelzell-qPCR.....	41
3.8.4.1	Prinzip	41
3.8.4.2	Methodik	42
3.9	Verlaufsbeobachtungen CD90-positiver Zellen	44
3.9.1	Prinzip	44
3.9.2	Methodik	44

4 Ergebnisse.....	46
4.1 Etablierung des Separationsregimes	47
4.2 Charakterisierung CD90-positiver Zellen.....	55
4.3 Quantitativer CD90-Nachweis an Patientenmaterial	67
5 Diskussion	79
Quellenverzeichnis.....	i
Abbildungsverzeichnis	xiii
Tabellenverzeichnis	xvii
Materialien	xxi
Anhang.....	xxxii

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
α -SMA	alpha-glattes Muskelaktin
ABC-Methode	(Strept-)Avidin-Biotin Complex-Methode
AML	Akute Myeloische Leukämie
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
Ca.	Karzinom
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CO ₂	Kohlendioxid
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
D-PBS	Dulbecco's Phosphatpuffer (ohne Calcium und Magnesium)
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EndMT	Endotheliale-mesenchymale Transition
EpCAM	epitheliales Zelladhäsions/-aktivierungs Molekül (epithelial cell adhesion molecule)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting)
FAP- α	Fibroblasten-Aktivierungs-Protein-alpha (fibroblast activation protein-alpha)
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSP-1	Fibroblasten-spezifisches Protein 1 (fibroblast-specific protein-1)
GUS-B	beta-Glukuronidase (beta-glucuronidase)
HBMEC	Human Brain Microvascular Endothelial Cells
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (hepatocellular carcinoma)
HER-2/neu	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
hTERT-BJ1	hTERT immortalisierte Vorhaut-Fibroblasten
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
ITGB1	Integrin beta 1
K562	Leukämie-Zelllinie
MACS	magnetisch-aktivierte Zellsortierung (magnetic activated cell sorting)
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7, Brustkrebszelllinie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex
pTNM	Tumor-Lymphknoten-Metastasen-Klassifikation (pathologisch)
qPCR	quantitative PCR
RBC	rote Blutzellen (red blood cells)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SCF	Stammzellfaktor (stem cell factor)
SDF-1	Stroma-abgeleiteter Faktor 1 (stromal cell-derived factor-1)
TAC	Tetramerer Antikörperkomplex
TAF	Tumor-assoziiierter Fibroblast
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS-gepufferte Saline
Thy-1	Synonym für CD90 (THYmocyte differentiation antigen 1)
ü.N.	über Nacht
VEGFR-1	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (vascular endothelial growth factor receptor-1)

Einheiten:

µl	Volumen [Mikroliter, $1 \cdot 10^{-6}$ l]
ml	Volumen [Milliliter, $1 \cdot 10^{-3}$ l]
pg	Masse [Pikogramm, $1 \cdot 10^{-12}$ g]
µg	Masse [Mikrogramm, $1 \cdot 10^{-6}$ g]
mg	Masse [Milligramm, $1 \cdot 10^{-3}$ g]
µmol	Stoffmenge [Mikromol, $1 \cdot 10^{-6}$ Mol]
mmol	Stoffmenge [Millimol, $1 \cdot 10^{-3}$ Mol]
mol	Stoffmenge [Mol]
µM	Konzentration [Mikromol ($1 \cdot 10^{-6}$ Mol) pro Liter, µmol/l]
mM	Konzentration [Millimol ($1 \cdot 10^{-3}$ Mol) pro Liter, mmol/l]
M	Konzentration [Mol pro Liter, mol/l]
°C	Temperatur [Grad Celsius]
%	Anteil [1/100]
sec	Zeit [Sekunde]
min	Zeit [Minute, 60 sec]
h	Zeit [Stunde, 60 min]
× g	Zentrifugalkraft [Vielfaches der Erdanziehung g] $= (1.119 \cdot 10^{-5}) \cdot \text{rpm}^2 \cdot r$, rpm=Umdrehungen pro Minute r=Rotorradius [cm]
bp	DNA-Fragmentlänge [Anzahl von Basenpaaren]
kb	DNA-Fragmentlänge [Anzahl von Basenpaaren, 10^3 bp]
Da	Masseneinheit, ähnlich Masse des Wasserstoffatoms [Dalton]
kDa	Masseneinheit, [10^3 Dalton]
U	Enzymaktivität [Unit, µmol/min]
A	Stromstärke [Ampere]
V	Spannung [Volt]

Zusammenfassung

In der Onkologie gibt es noch immer eine Diskrepanz zwischen dem experimentellen Wissen über die Biologie von Tumoren und der Übertragung dieses Wissens in die klinische Anwendung. Es besteht daher großes Interesse an der Etablierung geeigneter Biomarker für die Früherkennung, Diagnose und Prognose von Tumorerkrankungen. Diese sollten in minimal invasiv gewonnenen Proben wie dem peripheren Blut einfach und kostengünstig detektierbar sein. Während zirkulierende Tumorzellen in Blut und Knochenmark erstmals 2007 in einer Tumormarkerempfehlung der Amerikanischen Gesellschaft für klinische Onkologie (ASCO) erwähnt wurden, gibt es zur möglichen Rolle Tumor-assoziiierter Stromazellen nur wenige Anhaltspunkte. Tumoren bestehen aber nicht nur aus neoplastischen Zellen, sondern auch aus einem extrazellulären Milieu und Tumor-assoziierten Stromazellen. Daraus ergibt sich die Frage, inwiefern diese Komponenten an Prozessen wie der Metastasierung beteiligt sind und sich somit als Tumormarker eignen.

Ein bedeutender Zelltyp innerhalb des Stromas vieler Tumoren sind die Tumor-assoziierten Fibroblasten. Diese spielen eine Rolle im Rahmen der Initiation, Progression und Metastasierung von Tumoren, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind. Sie zeichnen sich dabei durch eine hohe Heterogenität aus, die auf die vielfältige zelluläre Abstammung zurückzuführen ist. Neben der Transdifferenzierung und Selektion ortsständiger Fibroblasten dürften im Rahmen von Metastasierungsereignissen vor allem die Rekrutierung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und das Herauslösen entsprechender Zellen aus dem Primärtumor von Bedeutung sein.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, diese beiden Zellpopulationen im peripheren Blut von Tumorpatienten nachzuweisen und sie anschließend näher zu analysieren. Dazu wurde zunächst ein Separationsverfahren etabliert, welches zu einer effizienten und schonenden Anreicherung der gesuchten Zellen führte. Eine nähere Charakterisierung der so isolierten Zellen wurde mittels molekularbiologischer und immunhistochemischer Methoden geführt. Zur Beurteilung der Dynamik dieser Zellpopulation sowie deren Bezug zur Entwicklung der Tumorerkrankung wurde außerdem ein Patientenkollektiv über den Zeitraum von einem Jahr auf das Vorkommen solcher Zellen im peripheren Blut hin untersucht.

Im Rahmen des verwendeten immunomagnetischen Separationssystems erwies sich CD90 als geeignetes Oberflächenantigen. Für dieses Molekül ist eine Expression in Fibroblasten

zahlreicher Spezies, diversen humanen Stammzellen sowie Gefäßen in aktivierten Geweben wie Tumoren beschrieben. CD90-positive Zellen konnten schließlich in sehr unterschiedlicher Zahl aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten isoliert werden. Deren anschließende immunhistochemische Analyse zeigte eine Koexpression mit anderen Stroma- und Stammzell-assoziierten Markern wie CD44, für welches bereits eine Beteiligung an Prozessen der Tumorprogression und Metastasierung beschrieben ist. Weiterhin ermöglichten qualitative und neu etablierte quantitative Ansätze einen Genexpressionsnachweis auf Einzelzellebene. Dabei zeigte sich eine robuste mRNA-Expression des Stammzellfaktors (SCF) in rund 80 % der untersuchten Zellen. Dieser wird von Fibroblasten und endothelialen Zellen konstitutiv exprimiert und vermittelt biologische Effekte wie die Proliferation, Differenzierung und Mobilisierung von Stamm- und Vorläuferzellen. Im Rahmen dieser Analysen wurde weiterhin festgestellt, dass es sich beim Auftreten CD90-positiver Zellen in der Peripherie um ein Entitäts- und Patientenspezifisches Phänomen handelt. Aus diesem Grund wurde in einer Verlaufsanalyse ein Kollektiv von 72 Patientinnen mit gynäkologischen Tumoren beobachtet. Dabei konnten CD90-positive Zellen bei 75 % dieser Patientinnen nachgewiesen werden, wobei die Zellzahl wiederholt anstieg und abfiel, was jedoch nicht direkt mit dem Auftreten von Metastasierungsereignissen assoziiert war. Für eine genauere Einschätzung dieses Sachverhalts sowie des Einflusses therapeutischer Interventionen sind eine größere Fallzahl und eine längere Nachbeobachtungszeit notwendig. Eine ebenfalls durchgeführte immunhistochemische Analyse an Primärtumorgewebe zeigte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dessen Stromagehalt und der Menge der in der Peripherie vorkommenden CD90-positiven Zellen.

Bei CD90-positiven Zellen handelt es sich um eine heterogene Zellpopulation mit vielfältigen Funktionen bei diversen biologischen Prozessen. Das im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene, mitunter zahlreiche Auftreten in der Peripherie von Tumorpatienten und die Koexpression mit anderen in diesem Zusammenhang beschriebenen Markern legt dabei auch eine Rolle im Rahmen von Tumorprogression und Metastasierung nahe. Zur Abschätzung des wirklichen Potentials als prognostischer Biomarker in diesem Kontext sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig. Besonders vor dem Hintergrund der Therapierelevanz von Tumor-Stroma-Interaktionen erscheint eine Weiterbeschäftigung mit dieser Thematik jedoch sehr sinnvoll.

Summary

Today there is a general discrepancy between the experimental knowledge about the biology of cancer and the translation of this knowledge into clinical practice. There is still a need for feasible biomarkers that could be easily detected in biological samples collected with minimally invasive methods like peripheral blood. In 2007 circulating tumor cells in blood and bone marrow were cited for the first time in the recommendations of the American Society of Clinical Oncology (ASCO) on tumor markers. The role of tumor associated stroma cells in this regard still needs to be elucidated. Tumors are very complex tissues that are composed not only of the founder neoplastic cells, but also of an extracellular milieu and the so-called tumor-associated stromal cells. This raises the question to what extent these tumor components are involved in processes like metastasis formation and whether they are suitable tumor markers.

Fibroblasts are a prominent cell type within the stroma of many tumors. They assume a role during tumor initiation, progression and metastasis formation at which underlying mechanisms are not completely understood. The high heterogeneity of this cell population due to different cellular origins may be a possible explanation. In addition to the transdifferentiation and selection of local fibroblasts, the recruitment of bone marrow precursor cells and the release of cells from the primary tumor may be relevant for metastasis formation.

The detection and characterization of those cells in the peripheral blood of tumor patients was the aim of this study. Therefore a separation procedure for the efficient and gentle cell enrichment was established. Subsequently the so isolated cells were further characterized on the protein and the gene expression level. Furthermore several patients were monitored to estimate the dynamic of the cell population and the relation to disease progression.

In line with the immunomagnetic separation system CD90 was recognized as a capable surface antigen. The expression of this protein has been described for fibroblasts in various species as well as diverse human stem cells and vessels in activated tissues like tumors. We were finally able to isolate CD90-positive cells from peripheral blood of tumor patients in different quantity. Their subsequent immunohistochemical analysis showed a coexpression with other stroma and stem cell associated proteins like CD44 which is also involved in tumor progression and metastasis formation. Furthermore a qualitative and a new

established quantitative approach allowed gene expression analyses on a single cell level. In this way a pronounced expression of the stem cell factor (SCF, kit-ligand) could be detected in about 80 % of the analyzed cells. SCF is constitutively expressed by fibroblasts and endothelial cells and mediates biological effects such as proliferation, differentiation and mobilization of stem cells and progenitor cells. In line with these analyses a tumor entity and patient specific appearance of CD90-positive cells could be observed. For this reason a collective of 72 patients with gynecological tumors was monitored over a period of approximately one year. CD90-positive cells could be detected in 75 % of patients whereat their number increases and decreases repeatedly over time but probably not in relation to the occurrence of metastasis. For an accurate evaluation of these data and an estimation of the influence of the respective therapeutic interventions more cases and a longer follow-up period are necessary. An also accomplished analysis of tumor tissue from the corresponding primary site showed no significant correlation between its stroma content and the number of CD90-positive cells in the periphery yet.

CD90-positive cells are a heterogeneous cell population with multifaceted functions in diverse biological processes. The in part numerous presence in the peripheral blood of tumor patients demonstrated in this study along with the detected coexpression of other related markers hypothesize a participation in tumor progression and metastasis formation. The evaluation of the effective potential of CD90 as a biomarker in this context requires further investigation. Especially against the background of the therapeutic relevance of tumor stroma interactions ongoing work on this topic is needed.

1 Einleitung

1.1 Krebs im Allgemeinen

Die aktuelle Erhebung des Robert Koch-Institutes weist für das Jahr 2006 insgesamt ca. 426.800 Krebsneuerkrankungen in Deutschland aus. Bei den Frauen ist nach wie vor das Karzinom der Brustdrüse die häufigste Krebsneuerkrankung (58.000 Fälle), bei den Männern das Prostatakarzinom (60.100 Fälle). Mit 210.930 Todesfällen war rund ein Viertel aller Todesfälle des Jahres auf Tumor-assoziierte Ereignisse zurückzuführen (Krebs in Deutschland 2005/2006).

Bei der Entstehung von Tumoren handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess im Zuge dessen genetische Veränderungen zur progressiven Transformation von normalen hin zu hoch malignen Zellen führen. Diese zeichnen sich in erster Linie durch Veränderungen in regulatorischen Mechanismen der Zellproliferation und Homöostase aus. Im Jahr 2000 beschrieben Hanahan und Weinberg sechs Meilensteine der Krebsentstehung, die Jahrzehnte intensiver Krebsforschung zusammenfassen (Hanahan und Weinberg, 2000). Die meisten Tumoren erwerben demnach während ihrer Entwicklung die gleichen funktionellen Eigenschaften, wenn auch durch verschiedene Mechanismen (siehe Abb. 1).



Abb. 1: Erworbene Eigenschaften maligner Zellen (modifiziert nach Hanahan und Weinberg, 2000)

Krebszellen sind in der Lage, sich autonom mit Wachstumssignalen zu versorgen und zeigen dadurch eine reduzierte Abhängigkeit von exogenen Wachstumsstimuli. Auf der

anderen Seite entziehen sich maligne Zellen anti-proliferativen Signalen durch die Inaktivierung vermittelnder Gene, Signalwege und Rezeptoren. Ein weiteres typisches Kennzeichen zahlreicher Tumoren ist der z.B. durch Mutationen bedingte Funktionsverlust pro-apoptotischer Regulatoren, welcher zu einer erworbenen Resistenz gegenüber Apoptosemechanismen führt. Neben diesen drei Aspekten, die zu einem Entkoppeln des Zellwachstums von exogenen Signalgebern führen, bedarf ein expansives Tumorwachstum auch einer Störung der Zell-autonomen intrinsischen Wachstumsregulation und einer ausreichenden Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Im Verlauf der Entwicklung der meisten Tumoren kommt es außerdem früher oder später zur Gewebeinvasion und Metastasierung. Diese komplexen, bisher noch wenig verstandenen Prozesse sind ursächlich für 90 % aller Tumor-assoziierten Todesfälle. Von Bedeutung sind hierfür in erster Linie Änderungen in der physikalischen Bindung der Zellen an ihr Mikromilieu und die Aktivierung extrazellulärer Proteasen. Die erhöhte Produktion Matrix-degradierender Proteasen erfolgt dabei nicht selten zunächst indirekt durch die beteiligten Stroma- und Entzündungszellen. Die zugrunde liegenden regulatorischen und molekularen Mechanismen unterscheiden sich in Abhängigkeit vom betroffenen Gewebe. Der Erwerb all dieser Eigenschaften erfolgt in unterschiedlicher Reihenfolge und Ausprägung sowohl bei gleichen als auch bei verschiedenen Tumortypen, führt aber letztendlich zum gleichen Ergebnis (Übersicht: Hanahan und Weinberg, 2000).

1.2 Tumoren sind komplexe Gewebe

Heute weiß man, dass ein Teil dieser beschriebenen Eigenschaften nicht durch die Tumorzellen selbst, sondern durch Komponenten des umgebenden Tumorstromas verwirklicht wird. Dies führte zu einer Erweiterung des lange Zeit auf die Tumorzellen reduzierten Fokus auf ein Konzept, welches normale Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft als deren aktive Partner ansieht. Somit verstehen sich Tumoren als komplexe Gewebe, die nicht nur aus den neoplastischen Zellen bestehen aus denen sie hervorgehen, sondern auch aus einem extrazellulären Milieu, welches Matrixkomponenten, Chemokine und Zytokine umfasst, und den Tumor-assoziierten Stromazellen. Zu diesen gehören unter anderem Tumor-assoziierte Fibroblasten (TAFs), Perizyten und Endothelzellen sowie Leukozyten der myeloiden und lymphatischen Reihe (siehe Abb. 2). Alle zusammen tragen zur hohen Komplexität des sog. Tumormikroenvironments bei.

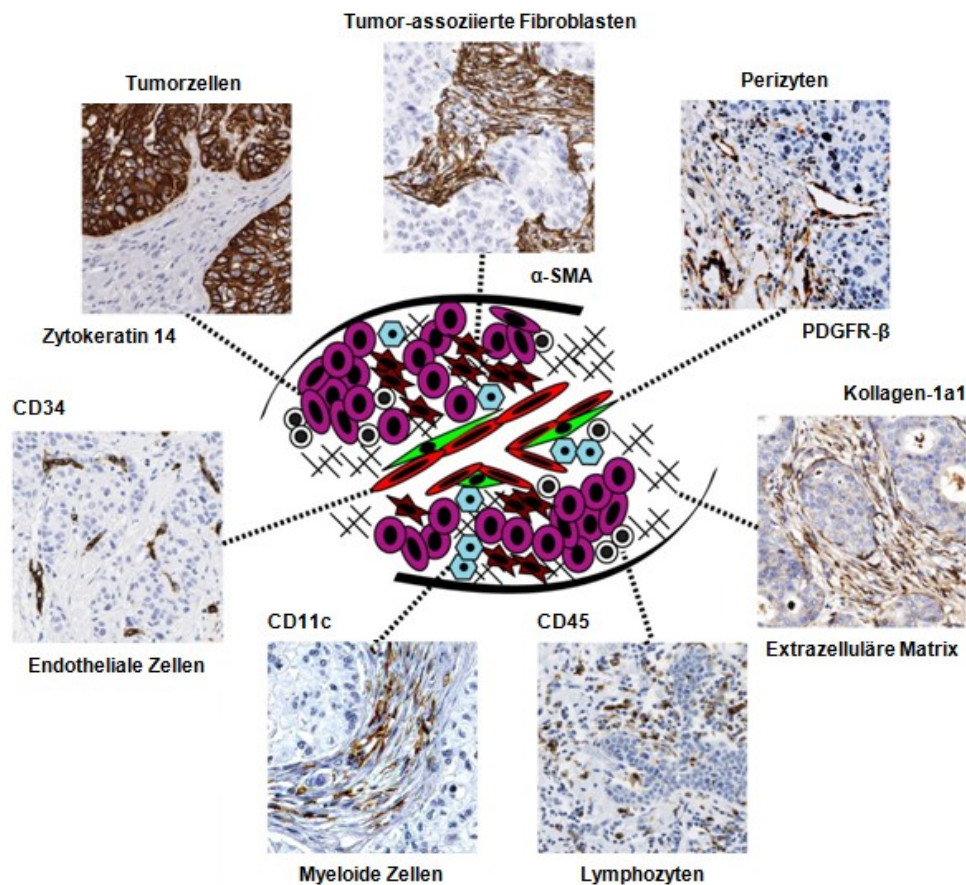


Abb. 2: Tumoren als komplexe Gewebe

Schematische Darstellung der verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Tumors umgeben von entsprechenden immunohistochemischen Färbungen am Mammakarzinom (Tumorzellen: Zytokeratin 14; Tumor-assoziierte Fibroblasten: alpha-glattes Muskelaktin (α -SMA); Perizyten: Platelet derived growth factor receptor beta (PDGFR- β); Extrazelluläre Matrix: Kollagen-1a1; Lymphozyten: CD45; myeloide Zellen: CD11c; endotheliale Zellen: CD34 (modifiziert nach Pietras und Östman, 2010).

Die genaue Zusammensetzung des Stromas variiert zwischen verschiedenen Tumortypen und -lokalisationen, wobei der Anteil bis zu 90 % betragen kann. Diese stromalen Elemente sind wesentlich an der Entstehung und Progression bestimmter Tumoren beteiligt und gelten daher als potentielle diagnostische und prognostische Marker. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass viele Tumoren nicht in der Lage sind, die Schranken eines normalen Mikromilieus zu überwinden, bis das Stroma selbst eine Reihe von Veränderungen durchläuft. Dabei scheinen die Tumorzellen den Anstoß für vielfältige Modifikationen im Bereich des Stromas zu geben, welche dann wiederum die Tumorigenese der epithelialen Zellen ermöglichen. Einmal irreversibel transformiert erlangen die neoplastischen Zellen schließlich ihre Unabhängigkeit vom Stroma (Übersicht: Beacham und Cukierman, 2005). Desweiteren scheint das Tumormikromilieu entscheidenden Einfluss auf den Erfolg therapeutischer Interventionen zu haben, in dem es z.B. durch die Regulation des interstitiellen Drucks im Tumor den Transkapillartransport

von Medikamenten negativ beeinflusst (Übersicht: Pietras und Östman, 2010). So könnten Interaktionen zwischen dem Tumor und diesen Wirtszellen und auch deren autonome Eigenschaften eine Erklärung für das unterschiedliche Therapieansprechen verschiedener Patienten mit histologisch ähnlichen Tumoren sein (Franco et al., 2010). Verschiedene Aspekte dieser Tumorstromabiologie, wie die Unterstützung von Proliferation, Angiogenese und Invasion, lassen vermuten, dass ein mit den Tumorzellen kombiniertes Targeting die Therapieeffektivität deutlich steigern würde. So könnte zum einen der negative Einfluss des Tumormikromilieus auf die Verteilung therapeutisch wirksamer Substanzen sowie die Wirtsimmunabwehr eingeschränkt werden. Zum anderen dürften Patienten von einer Hemmung der im Rahmen von Chemo- und Radiotherapie auftretenden Fibrose und der mit Metastasierung assoziierten Rekrutierung von Zellen aus dem Knochenmark profitieren. Desweiteren bieten die zumeist epigenetisch bedingten Unterschiede in der Genexpression zwischen normalem und Tumor-assoziiertem Stroma selbst Ansatzpunkte für verschiedene neue Therapiestrategien. Dabei wirkt sich die im Vergleich zu den epithelialen Zellen höhere genetische Stabilität der Stromazellen positiv auf die Entstehung von Therapieresistenzen aus (Übersicht: Gonda et al., 2010).

1.2.1 Tumor-assoziierte Fibroblasten (TAFs)

Fibroblasten an sich wurden erstmals Ende des 19. Jahrhunderts auf der Grundlage ihrer Lokalisation und ihrer mikroskopisch erkennbaren spindelförmigen Morphologie beschrieben. Es handelt sich bei Fibroblasten um nicht-vaskuläre, nicht-epitheliale und nicht inflammatorische Zellen, die die grundlegenden zellulären Komponenten des Bindegewebes bilden und damit zur strukturellen Integrität beitragen. Durch die Synthese von Kollagen, Laminin und Fibronectin sowie Matrixmetalloproteinasen sind sie entscheidend an der Steuerung des Auf- und Abbaus der Extrazellulärmatrix beteiligt. Fibroblasten spielen außerdem eine wichtige Rolle in der Regulation der epithelialen Differenzierung sowie von Entzündungs- und Wundheilungsprozessen. Während sie in gesunden Organen nur einen niedrigen Proliferationsindex und eine minimale metabolische Kapazität zur Aufrechterhaltung der normalen Gewebemöostase haben, werden sie z.B. im Rahmen der Wundheilung aktiviert. Dies führt zu einem Phänotypwechsel, erhöhter Proliferation sowie der gesteigerten Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix und verschiedener Zytokine (siehe Abb. 3). Nach der Wiederherstellung des

verletzten Gewebes kehren die Fibroblasten in ihren ruhenden Ausgangszustand zurück (Übersicht: Kalluri und Zeisberg, 2006; Xouri und Christian, 2010).

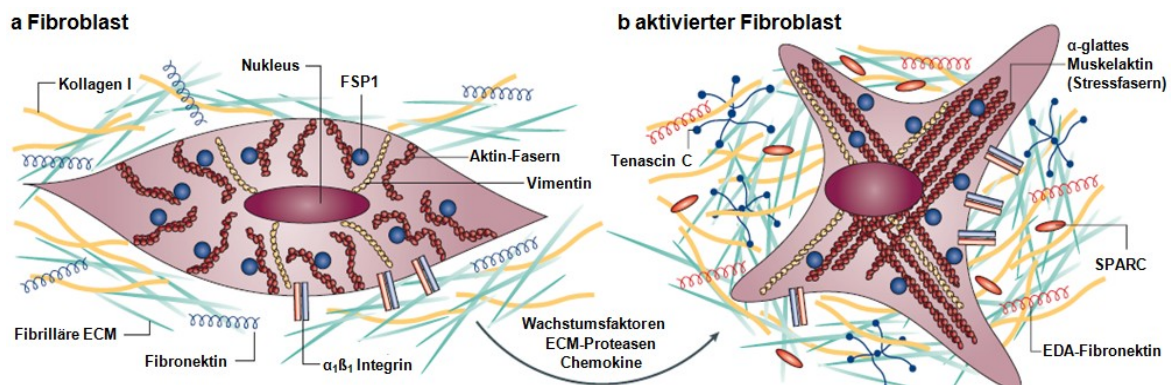
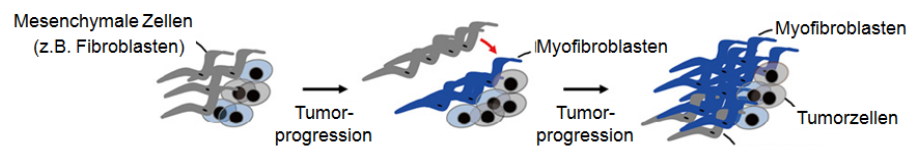


Abb. 3: Aktivierung von Fibroblasten

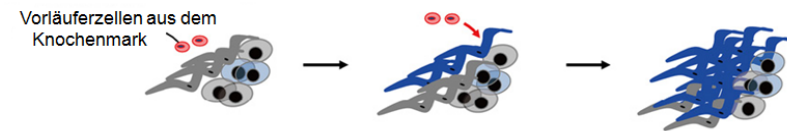
(a) Normale Fibroblasten sind eingebettet in eine fibrilläre Extrazellulärmatrix (ECM) aus Bindegewebe, welche hauptsächlich aus Typ 1 Kollagen und Fibronectin besteht, und interagieren mit diesen über Integrine. Fibroblasten erscheinen typischerweise als spindelförmige Zellen mit einem ausgeprägten Aktin-Zytoskelett und Vimentin-Intermediärfilamenten. Ein für Fibroblasten in normalem Gewebe beschriebener Marker ist das Fibroblasten-spezifische Protein 1 (FSP-1). (b) Fibroblasten können außerdem einen aktivierten Phänotyp annehmen, welcher mit verstärkter Proliferation, gesteigerter Produktion von ECM-Proteinen wie Typ 1 Kollagen, Tenascin C sowie Fibronectin mit der Extra-Domäne-A (EDA-Fibronectin) und SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) einhergeht. Phänotypisch sind aktivierte Fibroblasten mit der Expression von alpha-glattem Muskelaktin (α -SMA) assoziiert. Die Vermittlung der Aktivierung erfolgt durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie den Transformierenden Wachstumsfaktor beta (TGF- β), Chemokine und ECM-degradierende Enzyme (modifiziert nach Kalluri und Zeisberg, 2006).

Fibroblasten sind aber nicht nur Bestandteil normaler Gewebe, sondern auch eine wichtige Komponente des Stromas verschiedener solider Tumoren. Der Begriff Fibroblast umfasst hier eine Reihe stromaler Zellen mit ähnlichem Phänotyp, die jedoch im Gegensatz zur Wundheilung fortwährend aktiviert sind, weshalb man Tumoren auch als „nicht-heilende Wunden“ verstehen kann (Dvorak, 1986). Dieser biologisch aktive Fibroblastenzelltyp wird in der Literatur auch als reaktiver Fibroblast, peritumoraler Fibroblast, Myofibroblast, Karzinom- oder Tumor-assoziiierter Fibroblast (TAF) bezeichnet und ist der prominenteste Zelltyp innerhalb des Tumorstromas vieler Tumoren, insbesondere aber des Mamma- und Pankreaskarzinoms. Sein Anteil an der gesamten Tumormasse liegt hier zwischen 50 % und 70 % (Desmouliere et al., 2004). Dabei handelt es sich jedoch um verschiedene Subpopulationen, die sich in ihrer Markerexpression, einschließlich alpha-glattem Muskelaktin (α -SMA), Platelet derived growth factor receptor (PDGFR) und Fibroblasten-spezifischem Protein (FSP)-1, nur teilweise überlappen. Diese Heterogenität könnte mitunter auf ihre unterschiedliche Abstammung zurückzuführen sein. Aktuelle Studien und Daten diskutieren in diesem Zusammenhang verschiedene Möglichkeiten (siehe Abb. 4; Shimoda et al., 2010).

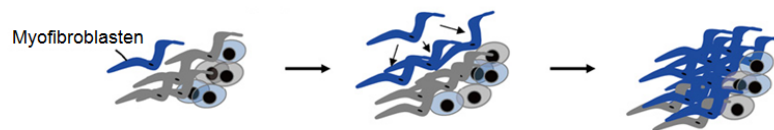
1) Transdifferenzierung in Myofibroblasten



2) Differenzierung in Myofibroblasten



3) Selektion existierender Myofibroblasten



4) Selektion genetisch veränderter Fibroblasten

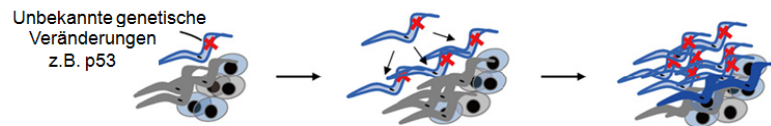


Abb. 4: Alternative Modelle zu Ursprung und Evolution von Myofibroblasten im Tumorstroma

(1) Populationen ortsständiger mesenchymaler Zellen (z.B. stromale Fibroblasten) durchlaufen, wie auch im Rahmen von Wundheilungsprozessen, eine von genetischen Änderungen unabhängige Transdifferenzierung zu Myofibroblasten; (2) spezialisierte zirkulierende Vorläuferzellen, wie Fibrozyten und mesenchymale Stammzellen werden ins Stroma rekrutiert, wo sie in der Lage sind, zu Myofibroblasten zu differenzieren; (3) eine seltene Zellpopulation bestehender Myofibroblasten könnte klonal in den Tumor expandieren; (4) der Erwerb genetischer Veränderungen (z.B. Verlust des Proteins 53 (p53)) innerhalb einer kleinen Fibroblasten- und/oder Vorläuferzellen-Population könnte deren klonale Selektion und Expansion ermöglichen, wobei diese Zellen nicht zwingend zu Myofibroblasten differenzieren müssen (Shimoda et al., 2010).

Neben mesenchymalen können auch epitheliale und endotheliale Zellen Ursprung für die Transdifferenzierung zu Myofibroblasten sein. Hierbei erlangen wahrscheinlich sowohl normale als auch maligne Zellen im Rahmen der Epithelialen-(EMT) bzw. Endothelialen-mesenchymalen Transition (EndMT) mesenchymale Eigenschaften (Kalluri und Zeisberg, 2006; Zeisberg et al., 2007). Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass TAFs innerhalb eines Tumors keinen gemeinsamen Ursprung haben, sondern von verschiedenen Zellen abgeleitet sind. Über die Herkunft und den jeweiligen Anteil in humanen Tumoren liegen bislang nur wenige Informationen vor (Anderberg und Pietras, 2009). Die Bedeutung stromaler Fibroblasten für Initiation, Progression und Metastasierung von Tumoren konnte in Koinjektionsversuchen von Tumorzellen und mesenchymalen Zellen verschiedenen Ursprungs mehrfach gezeigt werden. So stimulieren TAFs z.B. durch die Bereitstellung verschiedener Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine kontextabhängig die Tumorzellproliferation (Pietras und Östman, 2010). Die genauen Mechanismen, über

welche TAFs diese pro-tumorigenen Eigenschaften erwerben, sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Das Auftreten somatischer genetischer Veränderungen wird dabei ebenso wie deren funktionelle Relevanz kontrovers diskutiert. Zum einen scheinen Zellen des Stromas hinsichtlich genetischer Mutationen nicht maligne zu sein, sondern ihre veränderte Genexpression über epigenetische Mechanismen zu verwirklichen (Übersicht: Sund und Kalluri, 2009). Zum anderen wird eine ähnliche Mutationshäufigkeit in Tumorzellen und dem umgebenden Stroma beschrieben, wobei die Mutationen aber nur selten identisch sind (Übersicht: Kalluri und Zeisberg, 2006).

1.2.2 Fibroblasten-assoziierte Marker

Das Fehlen eines zuverlässigen und spezifischen molekularen Markers ist bisher der limitierende Faktor bei in vivo Untersuchungen von Fibroblasten. Zwar gibt es einige gut etablierte Indikatoren bestimmter Fibroblasten Phänotypen, aber keiner von ihnen wird ausschließlich von Fibroblasten und gleichzeitig in allen Fibroblasten exprimiert (Kalluri und Zeisberg, 2006). Der am häufigsten zur Identifizierung von Myofibroblasten herangezogene Marker ist das alpha-glatte Muskelaktin (α -SMA), welches z.B. in Kombination mit Vimentin und Desmin verschiedene Myofibroblasten-Subpopulationen definiert (Übersicht: Kunz-Schughart und Knuechel, 2002). Zusätzlich können Marker wie das Fibroblasten-spezifische Protein 1 (FSP-1) (Sugimoto et al., 2006) und das Fibroblasten-Aktivierungs-Protein-alpha (FAP- α) zur Charakterisierung von Fibroblasten herangezogen werden. Bei letzterem handelt es sich um eine Membran-integrale Serin-Proteinase mit Gelatinase-Aktivität, die auf der Oberfläche reaktiver stromaler Fibroblasten in 90 % aller Lungen-, Brust-, und Kolon-Tumoren sowie während der Wundheilung exprimiert wird (Übersicht: Kunz-Schughart und Knuechel, 2002). Die genaue biologische Funktion und die Bedeutung im Rahmen der Tumorigenese sind dabei noch nicht vollständig verstanden und werden zum Teil auch kontrovers diskutiert. Trotzdem macht die differentielle Expression in Tumor- und Normalgewebe FAP- α zu einem vielversprechenden therapeutischen Target, dessen Potential bereits in verschiedenen vorklinischen und klinischen Studien untersucht wird (Übersicht: Hofmeister et al., 2008). In weiteren Untersuchungen deutete sich außerdem ein Zusammenhang zwischen der Expression von α -SMA und dem Zelloberflächen-Glykoprotein CD90 an (Koumas et al., 2003). CD90 wurde ursprünglich als der murine pan T-Zell-Marker Thy-1 (THYMocyte differentiation antigen 1) identifiziert (Raff, 1971).

Das 25-37 kDa große Protein besitzt keine Transmembrandomäne und ist durch einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker im äußeren Teil der Lipid-Doppelschicht verankert. CD90 wird von neuronalen Zellen und Fibroblasten zahlreicher Spezies exprimiert. Beim Menschen findet man es außerdem auf endothelialen Zellen, glatten Muskelzellen und einer Subpopulation CD34-positiver Knochenmarkszellen (Übersicht: Haeryfar und Hoskin, 2004). Aktuell beschrieben wurde zudem die CD90-Expression auf Lymph- und Blutgefäßen in aktivierten Geweben wie z.B. Tumoren (Jurisic et al., 2010) sowie mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks (Dennis et al., 2007) und murinen Brustkrebsstammzellen (Cho et al., 2008). Die Ausprägung der CD90-Expression in Fibroblasten unterscheidet sich dabei in verschiedenen Organen (Bagloli et al., 2006) und führt zu einer phänotypisch veränderten Antwort auf Wachstumsfaktoren, Zytokine und Adhäsionsproteine (Barker und Hagood, 2009). Andere Daten zeigen, dass CD90-exprimierende Fibroblasten das Potential haben, zu Myofibroblasten zu differenzieren (Koumas et al., 2003). Die genauen biologischen Funktionen von CD90 bleiben jedoch trotz zahlreicher Untersuchungen in den letzten 45 Jahren unklar. Dies liegt zum einen an der fehlenden intrazellulären Domäne und zum anderen an der großen Heterogenität der CD90-exprimierenden Zellen. Gezeigt werden konnten bisher eine Beteiligung des Moleküls an der Vermittlung der T-Zell-Aktivierung sowie zahlreichen nicht-immunologischen biologischen Prozessen. Dazu zählen u.a. Zelladhäsion, Neuritenauswuchs, Tumorwachstum, Migration und Zelltod, die auf eine Funktion des Proteins als wichtiger Regulator von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen hindeuten (Übersicht: Rege und Hagood, 2006). Im Bereich der Tumorigenese konnten immunhistochemische Analysen am Prostatakarzinom eine distinkte und differentielle CD90-Überexpression im Tumorstroma gegenüber gesundem Gewebe nachweisen (True et al., 2010). Yang und Kollegen konnten in einer Untersuchung CD90 zudem als potentiellen Marker für Stammzellen des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) identifizieren. Dabei korrelierte die Anzahl aus HCC-Zelllinien isolierter CD90-positiver Zellen mit deren Tumorigenität und metastatischem Potential. Sie konnten auch zeigen, dass CD90-positive Zellen aus Tumorgewebe und Blutproben von HCC-Patienten in der Lage sind, im Tiermodell Tumorknötchen zu generieren (Yang et al., 2008). Weiterhin führte eine Blockade der Tumorgefäß-assoziierten Expression von CD90 im Tiermodell zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsion mehrerer Tumorzelltypen an die lymphatische Endothelzellschicht, was auf eine mögliche Rolle des Moleküls im Rahmen von

Metastasierungsprozessen hinweist (Jurisic et al., 2010). Aufgrund dieser Multifunktionalität, auch im Rahmen von Tumor-assoziierten Prozessen, scheint eine nähere Untersuchung von Tumor-Stroma-Interaktionen unter dem Gesichtspunkt der Expression des CD90-Oberflächenproteins sinnvoll.

1.3 Metastasierung

Rund 90 % aller Tumor-assoziierten Todesfälle lassen sich nicht auf den Primärtumor, sondern auf die Bildung von Metastasen zurückführen. Während ein Primärtumor z.B. in der Brust das Überleben nur selten gefährdet, stellen Metastasen in Organen wie Hirn, Leber, Knochen und Lunge durch deren Funktionsverlust eine lebensbedrohliche Situation dar. Metastasen entstehen, wenn sich Tumorzellen vom Tumor lösen, über Blut- und Lymphgefäße an entfernte Orte im Körper gelangen und sich dort absiedeln (siehe Abb. 5).

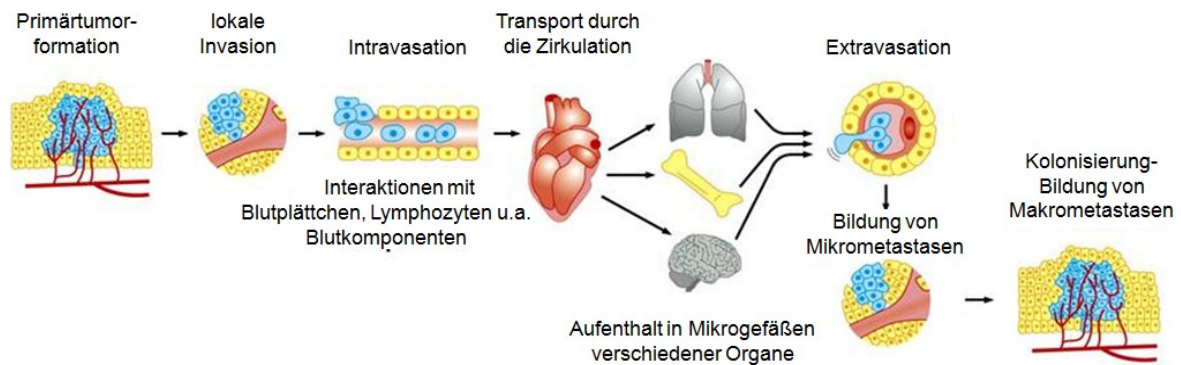


Abb. 5: Invasions-Metastasierungskaskade

Der selektive Prozess der Metastasierung setzt den erfolgreichen Abschluss verschiedener Schritte voraus. Die Tumorzellen müssen sich vom Primärtumor lösen, in das Wirtsgewebe und anschließend die Lymph- oder Blutgefäße eindringen, zum Kapillarbett entfernter Organe gelangen, in deren Parenchym invadieren und schließlich erneut proliferieren (modifiziert nach Weinberg, 2007).

Während Fortschritte bei der Entschlüsselung vieler Schritte der Tumorentstehung zu verzeichnen sind, sind Invasion und Metastasierung nur unzureichend verstanden. Dies gilt sowohl für die Ursache der unterschiedlichen Metastasierungshäufigkeit verschiedener Tumorentitäten als auch den Metastasierungszeitpunkt im Verlauf der Erkrankung. Die Tatsache, dass Tumorzellen schon Jahre vor der Entstehung von Metastasen z.B. im Knochenmark nachgewiesen werden können, zeigt, dass sich nicht alle disseminierten Tumorzellen auch zu Metastasen entwickeln (Braun et al., 2005), sondern es sich hierbei um ein eher seltenes Ereignis handelt. Paget beschrieb vor mehr als 100 Jahren anhand der „Seed and Soil“ (Samen und Boden)-Analogie den Prozess der Metastasierung und wies damit bereits auf den entscheidenden Einfluss des Tumormikromilieus auf das Verhalten

von Tumorzellen hin (Paget, 1889). In einer Autopsie-Untersuchung von 735 Patientinnen mit Brustkrebs konnte er zeigen, dass die Verteilung von Metastasen nicht zufällig stattfindet, sondern durch die Prädisposition des Metastasierungsortes reguliert wird. Zum Beispiel zeigte die Leber eine 14-fach höhere Metastaseninzidenz als die Milz, ein Organ mit vergleichbarem zirkulatorischem Volumen. Paget schlussfolgerte daraus, dass die Tumorzellen („der Samen“) zufällig in die Zirkulation streuen und nur dann Metastasen bilden können, wenn sie in ein geeignetes Milieu („Boden“) gelangen. Ob es sich bei den potentiellen Absiedlungsorten um „fruchtbaren Boden“ handelt, wird entscheidend von den Tumor-assoziierten Fibroblasten mitbestimmt, was zu einer Erweiterung der Analogie um „contracted farmers“ führte: Fibroblasten, die „im Auftrag“ der Tumorzellen das Mikromilieu vorbereiten (Cheng und Weiner, 2003). In diesem Zusammenhang konnte weiterhin gezeigt werden, dass ein Matrixumbau und die Rekrutierung aus dem Knochenmark stammender Zellen zur Etablierung der sog. prä-metastatischen Nische beitragen, welche essentiell für das Wachstum und das Überleben extravadiert metastatischer Zellen ist. Dabei mobilisieren von den primären Tumorzellen sezernierte Faktoren Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und rekrutieren diese über die Blutzirkulation zu Organ- und Tumorentitäts-spezifischen Nischen. Dort bilden diese Zellen, welche den Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (VEGFR-1) exprimieren, dann Zellcluster und unterstützen so die Tumorzelladhäsion und -proliferation (Kaplan et al., 2005). Was genau bestimmt, wo es zur Ausbildung dieser Nischen kommt ist noch nicht geklärt, jedoch scheinen Orte wiederholter mechanischer Beanspruchung besonders gefährdet (Übersicht: Erler und Weaver, 2009). Im Rahmen der Tumorprogression unterlaufen also einige der primären Tumorzellen wie auch das Tumormikromilieu charakteristische molekulare Veränderungen, die wesentlich für die Metastasierung sind. Zu den Tumorzell-intrinsischen Veränderungen zählen vor allem Abweichungen in der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, u.a. vermittelt durch den Funktionsverlust von E-Cadherin im Rahmen der Epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT). Bezüglich der an der Metastasierung beteiligten Gene konnte gezeigt werden, dass zirkulierende Tumorzellen verschiedene genetische Veränderungen tragen. Dabei beschränkt sich die Expression und Funktionalität vieler dieser Gene auf den metastatischen Prozess (Übersicht: Kopfstein und Christofori, 2006). Aber auch das Tumor-umgebende Mikromilieu trägt entscheidend zur Tumorzellinvasion und Metastasierung bei. So kommunizieren Tumor- und Stromazellen über lösliche

Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine und beeinflussen dabei ihr Verhalten gegenseitig in einer Metastasierungs-fördernden Weise. Zum Beispiel stimuliert der von den Tumorzellen freigesetzte Blutplättchen-Wachstumsfaktor (PDGF) Makrophagen zur Produktion des Transformierenden Wachstumsfaktors beta (TGF- β), welcher wiederum die Transdifferenzierung von Fibroblasten hin zu Tumor-assoziierten Fibroblasten induziert. Diese fördern dann durch die Sekretion von Chemoattraktanten die Infiltration von Makrophagen in den Tumor. Die weitere Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Proteasen unterstützt das Überleben, die Migration und die Invasion der Tumorzellen in das umgebende Gewebe. Desweiteren führen von Tumor- und Stromazellen produzierte Faktoren zur Bildung von Blut- und Lymphgefäßen und modulieren so das Immunsystem, die transformierten Zellen zu tolerieren (Kopfstein und Christofori, 2006).

1.4 Zirkulierende Tumorzellen

Die Anwesenheit von Tumorzellen in der peripheren Zirkulation wurde erstmals im Jahr 1869 von Ashworth beschrieben (Ashworth, 1869). Seitdem wird über Existenz, Ursprung und klinische Signifikanz dieser Zellen diskutiert. Aktuelle klinische und molekulare Studien belegen, dass zirkulierende Tumorzellen in verschiedenen Stadien der Progression detektiert werden können und das Invasions- und Metastasierungsereignisse bereits früh in der Tumorentwicklung auftreten können (Übersicht: Gasent Blesa et al., 2008). Andererseits sind Tumorzellen im peripheren Blut von Brustkrebspatientinnen auch noch Monate und Jahre nach Entfernung des Primärtumors nachweisbar (Meng et al., 2004; Pachmann, 2005). Der überwiegende Anteil befindet sich dabei in einem ruhenden, mitotisch inaktiven Stadium (G0-Phase) und entzieht sich somit z.B. der Wirkung adjuvanter Chemotherapie (Pantel et al., 1997). Was genau diese mitunter lange Tumorzell dormanz bewirkt ist bisher unklar. Es gibt zudem Hinweise darauf, dass im Rahmen der Rezirkulation zwischen Metastasierungsorten, das Knochenmark aufgrund seiner Milieueigenschaften als ein wichtiges Reservoir für Tumorzellen vieler Tumorentitäten fungiert (Übersicht: Pantel et al., 2008). Dabei weist zumindest ein Teil dieser Zellen Tumor-Stammzell Charakteristika, wie eine erhöhte Chemotherapieresistenz und eine herabgesetzte Proliferation, auf (Aktas et al., 2009). Moderne Technologien ermöglichen heute die Detektion und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen auf Einzelzellniveau. Grundlage vieler Ansätze stellen dabei EpCAM-basierte Anreicherungsverfahren dar. Bei diesem epithelialen Zelladhäsions/-aktivierungs Molekül

handelt es sich um das erste identifizierte Tumor-assoziierte Antigen, welches heute unter zahlreichen Synonymen wie HEA125 oder CD326 bekannt ist. EpCAM wird von einer großen Vielfalt humaner Adeno- und Plattenepithelkarzinome, aber auch von einer Reihe normaler Epithelien exprimiert (Übersicht: Baeuerle und Gires, 2007). Der Grad der Expression kann dabei stark variieren und zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Tumorentität. Vergleichende Studien zur Anzahl zirkulierender Tumorzellen im Knochenmark bzw. im peripheren Blut gibt es bisher nur wenige. Es scheint jedoch so, dass die Milieubedingungen im Knochenmark zu einer Anreicherung in diesem Kompartiment führen und, dass deren Anwesenheit mit einer größeren klinischen Signifikanz einhergeht (Übersicht Pantel et al., 2008). Allerdings handelt es sich bei der Knochenmarkaspiration um einen zeit- und kostenaufwendigen invasiven Eingriff, der hinsichtlich der Probenqualität nur schwer zu standardisieren ist, weshalb sich besonders im Rahmen von Verlaufskontrollen die periphere Blutabnahme durchgesetzt hat. So konnte u.a. gezeigt werden, dass die An- und Abwesenheit zirkulierender Tumorzellen im Verlauf der individuellen Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms als prädiktiver Faktor für das Therapieansprechen fungieren kann (Pachmann et al., 2005; Tewes et al., 2009). Dies ist besonders von Vorteil, da die Wirksamkeit einer Krebstherapie bisher nur retrospektiv durch das Ausbleiben oder die Entstehung von Metastasen beurteilt werden kann. Das Monitoring von Knochenmark und peripherem Blut während und nach systemisch adjuvanter Therapie könnte somit die Grundlage für einen Therapiewechsel bei Nichtansprechen darstellen und so die Entstehung von Metastasen verhindern. Aufgrund der entscheidenden Bedeutung des Tumorstromas für alle Phasen der Tumorprogression könnte auch der Nachweis zirkulierender stromaler Zellen oder disseminierter Vorläuferzellen aus dem Knochenmark hier einen Beitrag leisten.

1.5 Brustkrebs

Die epitheliale Komponente der Brust ist organisiert in Lobuli, welche aus Clustern sog. Acini bestehen. Diese führen in terminale Ductuli, die sich zu größeren vereinigen und in der Brustwarze enden. Eingebettet sind diese Elemente in ein Stroma aus Fett- und fibrösem Gewebe. Mehr als 95 % aller malignen Brusterkrankungen entstehen aus epithelialen Elementen und werden als Karzinome klassifiziert. Weiterhin differenziert man nicht invasive (*in situ*) und invasive Formen, bei welchen die Tumorzellen in Abhängigkeit des Progressionsgrades das umgebende Tumorstroma infiltrieren

(siehe Abb. 6). Die beiden häufigsten Subtypen invasiver Brusttumoren sind entsprechend ihrer Lokalisation das infiltrierende duktale Karzinom und das seltener vorkommende infiltrierende lobuläre Karzinom.

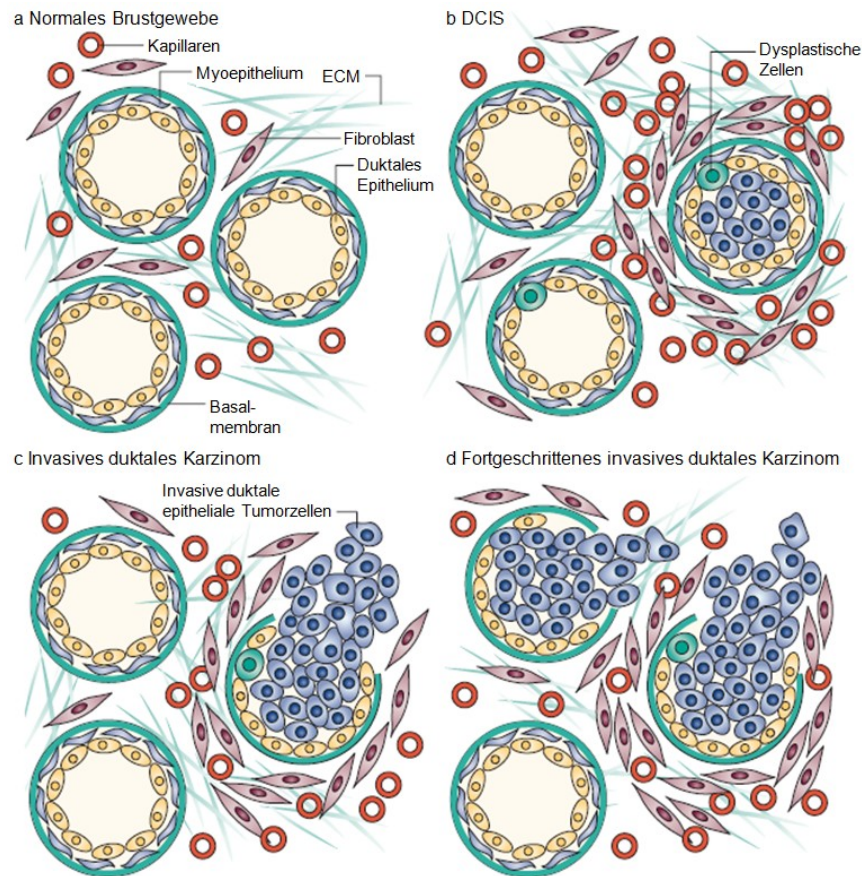


Abb. 6: Tumor-Stroma-Interaktionen während der Progression des dukalen Mammakarzinoms

(a) In der normalen weiblichen Brust sind das duktale Epithel und Myoepithel durch eine Basalmembran vom umgebenden Gewebe getrennt. (b) Im dukalen Carcinoma in situ (DCIS) enthält das Lumen aus der Proliferation transformierter Epithelzellen hervorgehende Karzinomzellen. Das umgebende Gewebe ist gekennzeichnet durch einen Umbau der Extrazellulärmatrix und eine Akkumulation von Fibroblasten. (c) Im invasiven duktales Karzinom durchbrechen die Karzinomzellen die Basalmembran. Das benachbarte Stroma enthält Myofibroblasten, entzündliche Infiltrate und neugebildete Gefäße. (d) Im fortgeschrittenen Mammakarzinom invadieren immer mehr Karzinomzellen in Form irregulärer Nester und Stränge das dichte fibröse Stroma (Kalluri und Zeisberg, 2006).

Mit einem Anteil von 29 % ist Brustkrebs die häufigste Krebsneuerkrankung bei Frauen. Die Brustkrebsinzidenz ist in Deutschland seit 1980 bis ins Jahr 2000 stetig angestiegen, seitdem ist die Rate in etwa gleichbleibend. Das mittlere Erkrankungsalter liegt dabei bei 64 Jahren. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für Brustkrebspatientinnen werden in Deutschland derzeit mit 83 % bis 87 % angegeben. Die Anzahl der Brustkrebs-bedingten Todesfälle lag im Jahr 2006 bei 17.286 (Krebs in Deutschland 2005/2006).

Bei Brustkrebs handelt es sich um eine äußerst heterogene Erkrankung. Die Ätiologie ist multifaktoriell und beinhaltet sowohl vererbte als auch erworbene Komponenten. Obwohl diese interagierenden Faktoren letzten Endes zur Entstehung von invasiven Malignomen führen, gehen sie mit den unterschiedlichsten genetischen Änderungen einher, was die hohe biologische Variabilität der Erkrankung zwischen einzelnen Patienten bedingt und individuelle Therapieansätze notwendig macht. Das Mammakarzinom fordert aus mehreren Gründen die Untersuchung von Tumor-Stroma-Interaktionen. Zum einen sind Brustepithelzellen schon während ihrer vielschrittigen Entwicklung bezüglich Proliferation, Differenzierung und Überleben entscheidend von Signalen des umgebenden Stromas abhängig. Diese Interaktionen könnten denen der Tumorigenese ähneln und lassen sich mittels Transplantationstechniken gut im Mausmodell untersuchen (Übersicht: Elenbaas und Weinberg, 2001). Zum anderen beträgt der Anteil des Tumor-assoziierten Stromas in vielen humanen Brusttumoren bis zu 80 % (Arendt et al., 2010) und ist auf histologischer Ebene bereits relativ gut untersucht. Weiterhin steht im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten durch Mamma-Reduktionsplastiken Material für die Isolierung und Kultivierung verschiedener Brustzelltypen zur Verfügung, welche sich u.a. für vergleichende Genexpressionsanalysen eignen. Die Rolle des Stromas in der Brustkrebspathogenese wird mittlerweile vielfach untersucht und es häufen sich Belege, die auf dessen pro-tumorigene Eigenschaften hinweisen. So konnte wiederholt gezeigt werden, dass die Entstehung und Progression von Brustkrebs hochgradig von einem spezialisierten Stroma abhängen, in dessen Abwesenheit sich Tumoren nur selten entwickeln (Übersicht: Arendt et al., 2010). Dabei treten die deutlichsten Veränderungen in der Genexpression der Fibroblasten und myoepithelialen Zellen auf, welche z.B. für die Ausbildung von Therapieresistenzen verantwortlich sind.

Aufgrund dieser stark heterogenen Zusammensetzung eines Tumors bedarf die Zuordnung spezialisierter Funktionen und Signale einer möglichst exakten Abgrenzung der verschiedenen Zellpopulationen. Bei der Untersuchung von Gewebeschnitten kommen dafür z.B. Laser-gestützte Mikrodissektionsverfahren zum Einsatz. Bei der Analyse zirkulierender Tumor-assoziiierter Zellen ist aufgrund der hohen Anzahl anderer Zellen in diesem Milieu bereits deren Detektion deutlich erschwert. Für einen daher oft unumgänglichen Anreicherungsschritt stehen vielfältige Methoden zur Verfügung.

1.6 Separationsmethoden

Zellen von biomedizinischem Interesse wie periphere hämatopoetische Stammzellen oder Tumorzellen sind trotz ihrer funktionellen Bedeutsamkeit oft nur in sehr geringer Zahl präsent ($1:>10^6$). Ein erster Schritt zur Detektion, Isolation und Analyse dieser Zellen besteht daher in einer Verbesserung des Verhältnisses „gesucht: gesamt“. Dies kann durch Anreicherung der Zellen von Interesse (Positivselektion) bzw. Depletion der unerwünschten Zellen (Negativselektion) geschehen. Separationsverfahren basieren dabei zum einen auf natürlichen Zelleigenschaften wie Größe, Dichte und Polarität (Sedimentation, Dielektrophorese) oder nutzen verschiedene Label wie Fluorophore (FACS) oder Magnetpartikel (MACS). Anforderungen an all diese Separationsverfahren sind neben einer hohen Effektivität und Spezifität vor allem der Erhalt der Zellvitalität. Besonders im Rahmen der Untersuchung zirkulierender Tumorzellen kommen vielfältige Ansätze zum Einsatz (siehe Abb. 7). Je nach Fragestellung und Häufigkeit der gesuchten Zellen sollte das beste Verfahren gewählt und weiter optimiert werden.

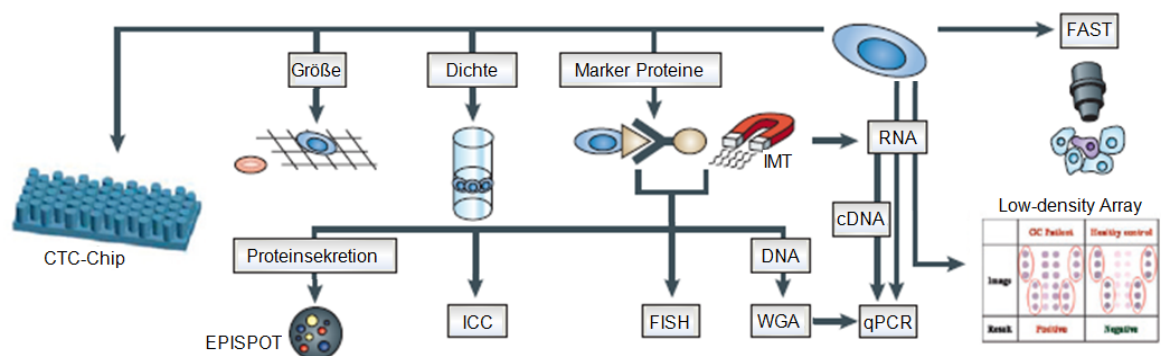


Abb. 7: Methoden zur Detektion, Anreicherung und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen (CTCs)
Die vorgestellten in vitro Anreicherungsmethoden basieren auf Zellgröße (Membranmikrofilter-Einheiten), Zelldichte (hauptsächlich angewendet für disseminierte Tumorzellen im Knochenmark), Markerproteinen, der Expression von Nukleinsäuren oder Mutationen. Immunomagnetische Bead-Technologien (IMT), welche spezifische Antikörper gegen Zelloberflächenproteine (z.B. EpCAM) nutzen, sind die am häufigsten angewendeten und können auch halbautomatisch durchgeführt werden. Die auf diese Weise angereicherten Zellen können mittels Immunzytochemie (ICC) und dem EPISPOT-System auf Proteinebene näher charakterisiert werden. Nukleinsäureanalysen können an den angereicherten Zellen oder direkt an RNA aus dem Blut durchgeführt werden. Weiterhin werden die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zur Detektion genetischer Abberationen und quantitative PCR (qPCR) Verfahren zur mRNA-Detektion Tumor-assoziiierter Zielgene eingesetzt. Die Nutzung einer Methode zur Amplifikation des ganzen Genoms (WGA) kann dabei die Menge der Ziel-DNA linear erhöhen. Außerdem verspricht ein im Anschluss an die reverse Transkription der aus dem Blut gewonnenen Gesamt-RNA durchgeführter colorimetrischer Membran basierter cDNA-Array durch die gleichzeitige Detektion verschiedener mRNAs Zugang zu einem Hochdurchsatz-Analyseverfahren für CTCs. Eine weitere Entwicklung auf diesem Gebiet stellt eine Mikrofluidik-Plattform dar, die EpCAM-positive Zellen an Mikrostrukturen auf einem Chip bindet (CTC-Chip). Die Nutzung eines automatisierten ultra speed Digital-Mikroskops (FAST) ermöglicht außerdem die Analyse von 300.000 Zellen pro Sekunde und detektiert so Fluoreszenz-markierte CTCs auf einem Objektträger (modifiziert nach Pantel et al., 2008).

2 Zielstellung

Tumor-assoziierte Fibroblasten stellen eine wichtige Komponente des Tumorstromas dar. Dabei gilt die Bedeutung ihrer Interaktion mit den epithelialen Tumorzellen für die Tumorentstehung schon länger als unbestritten. Über ihre Rolle im Rahmen der Tumorprogression und Metastasierung ist dagegen bisher nur wenig bekannt. Ein Beitrag zum besseren Verständnis dieser Zellen liegt in der Aufklärung ihrer Entstehung sowie ihrer Rolle bei der Fernmetastasierung. Dabei nutzen sowohl die Vorläuferzellen aus dem Knochenmark als auch vom Tumor freigesetzte Zellen die Blutbahn. Ziel der Arbeit soll es deshalb sein, diese beiden Zellpopulationen im peripheren Blut nachzuweisen und näher zu charakterisieren. Die Anreicherung von vitalen Zellen aus dem peripheren Blut, die von soliden Tumoren abgesiedelt werden, wird aber durch verschiedene Faktoren erheblich erschwert. So ist deren Zahl im Vergleich zur Leukozytenzahl verschwindend gering. Außerdem gilt die Identifizierung der Zellen mittels Oberflächenmarkern als ungenau, da bislang keine eindeutigen Tumor- bzw. Stromazell-spezifischen Marker für die Zirkulation definiert sind. Schließlich sind die bisher routinemäßig eingesetzten Separationsverfahren oftmals aufwändig und mit hohen Zellverlusten verbunden. Daher soll zunächst ein Separations- und Anreicherungsverfahren für „Nicht-Leukozyten“ etabliert werden, welches zu einer effizienten und schonenden Anreicherung der gesuchten Zellen führt.

Der Nachweis von EpCAM und Zytokeratin gilt als Beleg für epitheliale Zellen. Die Zellen des Tumorstromas weisen aber, zumindest in Teilen, mesenchymale Charakteristika auf. Deshalb sollen Vimentin, Aktin (alpha-smooth muscle), das Fibroblasten-aktivierende Protein- α und Gremlin zur Detektion dieser Zellen verwendet werden. Mesenchymale Stammzellen sollen über die Expression des Stammzellfaktors (SCF) erfasst werden. Hämatopoetische Vorläuferzellen, die zur Ausbildung von prä-metastatischen Nischen führen, sollen anhand von VEGFR-1 und SDF-1 identifiziert werden. Der Nachweis soll dabei mittels molekularbiologischer und immunhistochemischer Methoden geführt werden. Zur Beurteilung allgemeiner und Entitäts-spezifischer Aspekte soll, basierend auf den oben erhobenen Ergebnissen, ein Patientenkollektiv mit unterschiedlichen Tumorentitäten auf das Vorhandensein dieser Zellpopulationen hin untersucht werden. Eine anschließende Analyse im Zeitverlauf unter Einbeziehung der klinischen Daten soll die Dynamik der Populationen an Vorläuferzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten sowie deren Bezug zur Entwicklung der Tumorerkrankungen zeigen.

3 Material und Methoden

3.1 Blutaufarbeitung

3.1.1 Prinzip

In gesundem Blut treten Erythrozyten etwa tausendmal häufiger auf als Leukozyten und stellen somit ein Hindernis für deren Untersuchung dar. Aus diesem Grund wird vor Verfahren zur Analyse von Leukozyten oft ein Schritt zur Abtrennung der Erythrozyten durchgeführt. Eine Möglichkeit dabei stellt die Lyse mit Ammoniumchlorid dar.

Die verwendeten EDTA-Blutproben stammten von Patienten, die sich im Rahmen einer Tumorerkrankung in Behandlung durch das Universitätsklinikum Jena befinden und nach entsprechender Aufklärung ihr Einverständnis erklärten. Die Verwendung der Proben wurde durch die Ethik-Kommission der FSU Jena genehmigt (Bearbeitungsnummer: 0921-08/02). Die verwendeten Normalblutproben stammten von freiwilligen Spendern.

3.1.2 Methodik

Das mit EDTA als Antikoagulanzen versetzte periphere Blut wurde unter Zugabe des Erythrozytenlysepuffers (Verhältnis 1:10) 10 min bei Raumtemperatur lysiert und anschließend 10 min bei $300 \times g$ sedimentiert. Das resultierende Leukozytenpellet wurde in D-PBS-EDTA resuspendiert.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Prinzip

Als Zellkultur bezeichnet man die Kultivierung tierischer oder pflanzlicher Zellen in einem Nährmedium außerhalb des Organismus. Zellkulturen finden als Modellsysteme breite Verwendung in der biologischen Forschung, Entwicklung und Produktion.

Bei der verwendeten Fibroblasten-Zelllinie hTERT-BJ1 handelt es sich um eine aus der normalen Vorhaut eines männlichen Neugeborenen etablierte Zelllinie, welche nachträglich durch Transfektion mit der katalytischen Komponente des Enzyms Telomerase immortalisiert wurde (Bodnar et al., 1998). Die Zellen wurden uns freundlicherweise von apl. Prof. Dr. A. Berndt (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Jena) zur Nutzung überlassen. Die Primärkultur der Vorhaut-Fibroblasten wurde in der Klinik für Urologie

des Universitätsklinikums Jena angelegt. Die Zelllinie HBMEC (Human Brain Microvascular Endothelial Cells) entstammt einer Gehirnbioptie und wurde nachträglich mit dem großen T-Antigen des Simian Virus 40 immortalisiert (Stins et al., 2001). Sie wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. W. Reichardt (Fachhochschule Jena) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie MCF-7 wurde aus dem Pleuraerguss einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom isoliert (Soule et al., 1973). Die Suspensionszelllinie K562 entstammt dem Pleuraerguss einer Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie in terminaler Blastenkrise (Lozzio und Lozzio, 1975). Beide wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) bezogen.

3.2.2 Methodik

Alle Arbeitsschritte der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit 15 ml Medium und 10 % FCS im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre. Die Zellen wurden unter Verwendung von Trypsin alle 3 Tage im Verhältnis 1:2 bis 1:3 passagiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem Coulter[®] Z2 der Firma Beckman-Coulter. Zur Etablierung der verschiedenen Nachweissysteme wurden die Zellen auf verschiedenen Objektträgersystemen angezogen bzw. mittels Zytospin auf diese aufgebracht. Die Fixierung und Permeabilisierung erfolgte mit 100%igem eiskaltem Aceton. Die Präparate wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3 Zellzahlbestimmung

3.3.1 Prinzip

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit dem Coulter[®] Z2 basierend auf der Detektion von Widerstandsänderungen bzw. mikroskopisch mit der Neubauer Zählkammer.

3.3.2 Methodik

Zur Bestimmung der Zellzahl mit dem Coulter[®] Z2 wurden 25 µl der zu analysierenden Zellsuspension (zum Teil vorverdünnt) in 10 ml Isoton gegeben und vermessen. Die Ausgabe der Konzentration erfolgte als Zellzahl pro ml. Für die Nutzung der Neubauer Zählkammer wurde eine entsprechend vorverdünnte Zellsuspension einpipettiert und die Zellen in den acht Großquadraten ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte unter Berücksichtigung des Kammer- und des Verdünnungsfaktors.

3.4 Zellseparation

3.4.1 MOFLO™ High Performance Cell Sorter

3.4.1.1 Prinzip

Bei dem MOFLO™ High Performance Cell Sorter handelt es sich um ein modulares Hochdurchsatz-Durchflusszytometer. Die Zellen der zu analysierenden Zellsuspension werden in einzelnen Tropfen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz analysiert und voneinander getrennt (siehe Abb. 8). Das System erlaubt dabei die Separation von bis zu 70.000 Ereignissen pro Sekunde bei Aufrechterhaltung der Zellfunktionalität und -vitalität. Es eignet sich daher besonders für die Arbeit mit seltenen Zellpopulationen.

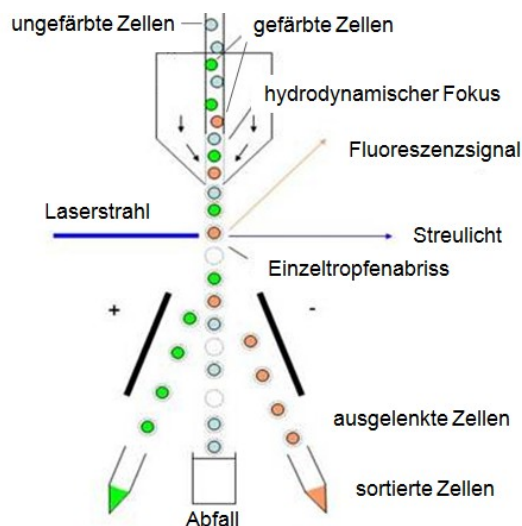


Abb. 8: Separationsprinzip des MOFLO™ High Performance Cell Sorter

Der Aufbau des MOFLO™ ermöglicht durch Generierung eines hydrodynamischen Fokus zunächst eine akkurate Vereinzelung der zu untersuchenden Zellen. Durch Anregung mit verschiedenen Lasern und Detektion der resultierenden Fluoreszenzsignale werden die Zellen in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Markierung abgelenkt und sortiert. Die unmarkierten, nicht ausgelenkten Zellen gelangen in einen Abfallbehälter (modifiziert nach Dr. Martin Förster, persönliche Mitteilung).

3.4.1.2 Methodik

Als Ausgangsmaterial für die Separation dienten die, wie unter 3.1.2 beschrieben, gewonnenen Leukozytenfraktionen der Tumorpatienten. Das nach der Erythrozytenlyse erhaltene Leukozytenpellet wurde in 500 µl D-PBS-EDTA resuspendiert und die Zellkonzentration bestimmt. Für die Separation am Moflo™ wurden anschließend $4 \cdot 10^6$ Zellen mit 3 µl CD45-PE und 3 µl EpCAM-FITC für 15 min bei 6 °C inkubiert und anschließend mit D-PBS-EDTA auf ein Volumen von 4 ml aufgefüllt (entspricht einer Arbeitskonzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml). Die Separation am Moflo™ erfolgte mit dem

Ziel der Leukozytendepletion anhand der CD45-PE-Markierung. Nach Bestimmung der Zellzahl in beiden erhaltenen Fraktionen wurden die Zellen weiteren Analysen zugeführt.

3.4.2 MACS®

3.4.2.1 Prinzip

Magnetic-activated cell sorting (MACS) ist eine Handelsmarke der Firma Miltenyi Biotec für eine Zellseparationsmethode verschiedener Zellpopulationen basierend auf der Wechselwirkung zwischen Antikörper-beschichteten magnetischen Nanopartikeln und Zelloberflächen-Antigenen. Die so magnetisch markierten Zellen werden über spezielle Säulen in einem MACS Separator von den unmarkierten separiert (siehe Abb. 9).

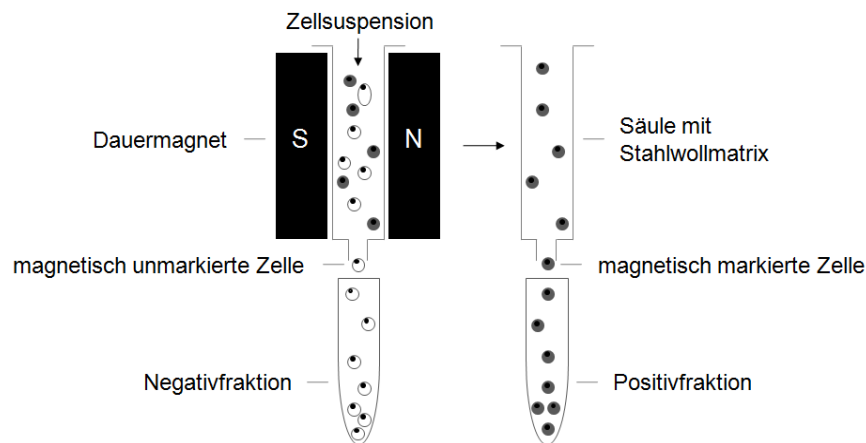


Abb. 9: Schematische Darstellung des MACS-Separationsprinzips

Innerhalb eines Zellgemisches werden die Zielzellen z.B. über Antigen-Antikörper-Interaktionen an magnetische Partikel gebunden. Diese Zellsuspension wird dann auf eine Trennsäule gegeben, die sich in einem Dauermagneten befindet. Während die unmarkierten Zellen die Säule ungehindert passieren, werden die markierten in ihr zurückgehalten und dann außerhalb des Magnetfeldes von der Säule eluiert.

Clement und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass Carboxymethyl-Dextran-umhüllte magnetische Nanopartikel ohne Antikörperbeschichtung von verschiedenen Zellen unterschiedlich schnell internalisiert werden (Clement et al., 2006). So ermöglicht die durch den unterschiedlichen Membranumsatz bedingte differentielle Partikelaufnahme durch Leukozyten und Tumorzellen deren Marker-unabhängige Separation.

3.4.2.2 Methodik

Die Zellen der während der Moflo™ CD45-Separation erhaltenen Fraktionen wurden 5 min bei 200× g sedimentiert und in 500 µl D-PBS-EDTA resuspendiert. Dazu wurden dann 2 µl der Carboxymethyldextran umhüllten Magnetnanopartikel gegeben und die Suspension wurde für 8 min bei 37 °C inkubiert. Die Auftrennung der Probe erfolgte

anschließend je nach Größe über MS oder LS MACS® Separationssäulen. Nach Bestimmung der Zellzahlen wurden die Zellen weiteren Analysen zugeführt.

3.4.3 RoboSep®

3.4.3.1 Prinzip

Hierbei handelt es sich um ein automatisiertes immunomagnetisches Zellseparationssystem, mit welchem Zellen anhand der Expression verschiedener Oberflächenmarker voneinander getrennt werden können (siehe Abb. 10).

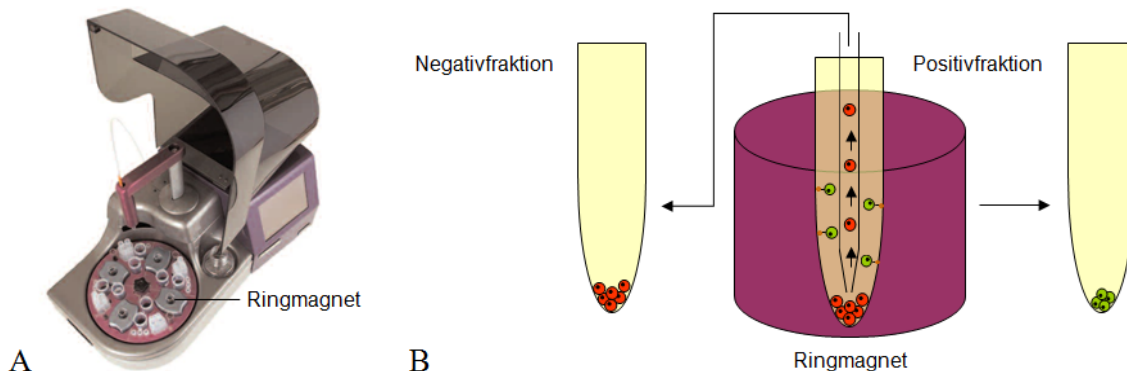


Abb. 10: Separationsprinzip des RoboSep® Systems

(A) Das RoboSep® System ermöglicht säulenfrei die parallele Separation von vier verschiedenen Proben, wenn notwendig, auch unter sterilen Bedingungen. Als Ausgangsmaterial eignen sich Zellen jeglicher Art, die im Anschluss an die Positiv- oder Negativselektion direkt weiter analysiert werden können. (B) Im Zuge der Separation werden die Zielzellen über spezifische Antikörper gegen Zelloberflächenmoleküle an kleine magnetische Nanopartikel gekoppelt, wodurch sie in einem Ringmagneten an der Gefäßwand zurückgehalten werden, während unmarkierte Zellen abpipettiert werden können. Die Dauer der Inkubation im Magneten und die Anzahl der Separationsschritte entscheiden über Reinheit und Ausbeute der Separation.

Neben der Nutzung vorsynthetisierter Tetramerer Antikörperkomplexe (TAC) besteht die Möglichkeit, gegen gelabelte Antikörper zu separieren bzw. TACs mit beliebigen Antikörpern selbst zu generieren (siehe Abb. 11).



Abb. 11: Aufbau der Tetrameren Antikörperkomplexe (TACs)

Die Tetrameren Antikörperkomplexe bestehen aus einem spezifischen Antikörper, welcher entweder diverse Label bereits an die Zielzelle gebundener Antikörper (A) oder ein spezielles Oberflächenantigen der Zielzelle (B) erkennt und über ein Kopplungsantikörperpaar an einen gegen Dextran gerichteten Antikörper gekoppelt ist. Dieser erkennt dann in einem zweiten Inkubationsschritt die Dextranhülle der magnetischen Nanopartikel (modifiziert nach www.stemcell.com/en/Products/Product-Type/Cell-isolation-products.aspx).

3.4.3.2 Methodik

Die Gewinnung der Leukozytenfraktion erfolgte wie unter 3.1.2 beschrieben aus einzelnen und gepoolten EDTA-antikoagulierten Blutproben von Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Für die RoboSep-Separation verwendete EDTA-Blutproben

<i>Anzahl Patienten entsprechender Tumorentitäten</i>					
gynäkologisch		urologisch		sonstige	
Mammakarzinom	286	Blasenkarzinom	32	Melanom	38
Ovarialkarzinom	12	Nierenkarzinom	14	Leberkarzinom	1
Zervixkarzinom	4	unbekannt	10	Magenkarzinom	1
Endometriumkarzinom	2				
Uteruskarzinom	1				
Vaginakarzinom	1				
unbekannt	6				

Zur Separation wurden zunächst ein FITC-gekoppelter CD90-Antikörper und ein Anti-FITC-Tetramerer Antikörperkomplex eingesetzt. Danach wurde die Leukozytenfraktion aus bis zu 20 ml peripherem Blut in einer Arbeitskonzentration von $1 \cdot 10^8/\text{ml}$ nach folgendem Protokoll automatisiert mit dem RoboSep-System separiert (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Protokoll zur indirekten CD90-FITC RoboSep-Separation

<i>Komponente</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Inkubationsdauer</i>		
FcR Blocking Antikörper	100 $\mu\text{l/ml}$			
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody FITC-conjugated [25 $\mu\text{g/ml}$]	120 $\mu\text{l/ml}$	45 min		
FITC Selection Cocktail	100 $\mu\text{l/ml}$	15 min		
Magnetische Nanopartikel	50 $\mu\text{l/ml}$	10 min		
Separationsschritte:	10 min	5 min	5 min	

Nach Inkubation mit den magnetischen Nanopartikeln erfolgte der Transfer der Probe in den Ringmagneten. Zwischen den einzelnen Separationsschritten wurde die Zellsuspension (Negativfraktion) abpipettiert und die an der Gefäßwand zurückgehaltenen Zellen

(Positivfraktion) mit je 2,5 ml RoboSep-Puffer wieder in Suspension gebracht. Nach Abschluss aller Separationsschritte lagen 7,5 ml Negativfraktion vor und die Zellen der Positivfraktion wurden per Hand ebenfalls in 7,5 ml RoboSep-Puffer resuspendiert. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei $200\times g$ wurden die Zellen entsprechend der weiteren Analyseverfahren in geringeren Volumina resuspendiert. Zu diesen zählten zunächst eine Zellzahlbestimmung und eine mikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie und Fluoreszenzfärbung.

Aufgrund der höheren Stabilität während der Separation und der größeren möglichen Methodenvielfalt im Anschluss an die Separation wurde in einem nächsten Schritt ein Tetramerer CD90-Antikörperkomplex generiert. Dazu wurden 15 µg des unkonjugierten CD90-Antikörpers und die Komponenten des RoboSep® Human "Do-It-Yourself" Selection Kit nach dem in Tab. 3 aufgeführten Protokoll zusammengegeben.

Tab. 3: Protokoll zur Generierung eines Tetrameren CD90-Antikörperkomplexes (CD90 Selection Cocktail)

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>	<i>Inkubationsdauer</i>
Komponente A	100 µl	
Komponente B	100 µl	5 h bis über Nacht bei 37 °C
Komponente C	100 µl	

Abschließend wurde die Lösung mit D-PBS auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Entsprechend der Herstellerhinweise erfolgte weiterhin eine Anpassung des Separationsprotokolls (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Protokoll zur direkten CD90-TAC RoboSep-Separation

<i>Komponente</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Inkubationsdauer</i>
CD90 Selection Cocktail (siehe Tab. 3)	100 µl/ml	15 min
Magnetische Nanopartikel	50 µl/ml	10 min
Separationsschritte:	10 min	5 min

Weiterhin wurde die direkte CD90-TAC RoboSep-Separation auch an Vollblut einzelner Patienten durchgeführt. Die dafür notwendige Anpassung des Separationsprotokolls (siehe Tab. 5) erfolgte in Absprache mit der Firma StemCell Technologies in Anlehnung an die verfügbaren Vollblut-Kits. Das maximale Probenvolumen der Vollblut-Separation lag bei 4,5 ml peripherem Blut.

Tab. 5: Protokoll zur direkten CD90-TAC RoboSep-Separation aus Vollblut

<i>Komponente</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Inkubationsdauer</i>
RBC-Lysis Buffer (1-fach konzentriert)	1:1	
CD90 Selection Cocktail (siehe Tab. 3) (1:4 verdünnt in RoboSep-Puffer)	50 µl/ml	30 min
Magnetische Nanopartikel (1:4 verdünnt in RoboSep-Puffer)	50 µl/ml	15 min
Separationsschritte:	10 min	5 min

Da für eine Subpopulation CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen ebenfalls eine CD90-Positivität beschrieben ist, wurden außerdem parallel CD34-Separationen mit dem RoboSep® Human CD34 Selection Kit durchgeführt (siehe Tab. 6).

Tab. 6: Protokoll zur direkten CD34 RoboSep-Separation

<i>Komponente</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Inkubationsdauer</i>
CD34 Selection Cocktail	100 µl/ml	15 min
Magnetische Nanopartikel	50 µl/ml	10 min
Separationsschritte:	10 min	5 min

Weiterhin wurde analysiert, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen CD90-positiver Zellen und der Anwesenheit EpCAM-positiver potentieller Tumorzellen in der Zirkulation gibt. Dazu wurden Patientenblutproben aufgeteilt und Separationen nach beiden Oberflächenantigenen durchgeführt. Für die Anreicherung EpCAM-positiver Zellen wurden entsprechend der nachfolgenden Analysen verschiedene Ansätze angewandt. Die Separation unter Verwendung eines Fluoresceinisothiocyanat-konjugierten Antikörpers (EpCAM-FITC, Miltenyi Biotec) erfolgte entsprechend dem in Tab. 2 aufgeführten Protokoll zur indirekten CD90-FITC RoboSep-Separation. Für eine direkte Anreicherung wurde das RoboSep® Human EpCAM Positive Selection Kit verwendet. Das hierfür herangezogene Protokoll entspricht dem zur direkten CD90-TAC RoboSep-Separation (siehe Tab. 4). Außerdem kam sowohl für die Anreicherung EpCAM- als auch CD90-positiver Zellen das RoboSep® Biotin Selection Kit zum Einsatz (siehe Tab. 7). Dieser Versuchsansatz wurde unter gleichen Bedingungen zudem für die Anreicherung VEGFR-1-positiver Zellen getestet, für die eine Beteiligung an der Bildung der prä-metastatischen Nische beschrieben ist.

Tab. 7: Protokoll zur Biotin-basierten indirekten CD90 bzw. EpCAM RoboSep-Separation

<i>Komponente</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Inkubationsdauer</i>	
FcR Blocking Antikörper	100 µl/ml		
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody Biotin-conjugated [50 µg/ml]			
bzw.			
Anti-Human EpCAM/Mouse Monoclonal Antibody Biotin-conjugated [50 µg/ml]	50 µl/ml	15 min	
bzw.			
Anti-Human VEGFR-1/Flt-1/Mouse Monoclonal Antibody Biotin-conjugated [50 µg/ml]			
Biotin Selection Cocktail	100 µl/ml	15 min	
Magnetische Nanopartikel	50 µl/ml	10 min	
Separationsschritte:	10 min	5 min	5 min

3.5 FACS (Fluorescence activated cell sorting)

3.5.1 Prinzip

Hierbei handelt es sich um ein durchflusszytometrisches Verfahren, bei dem Zellen entsprechend ihrer Größe, ihrer Komplexität und ihrer Fluoreszenzfärbung im Hochdurchsatz analysiert werden können.

3.5.2 Methodik

3.5.2.1 CD90-Marker Etablierung

Die Spezifität des CD90-Nachweises wurde u.a. durchflusszytometrisch an Tumorzellen und Fibroblasten geführt. Dazu wurden entsprechende Zelllinien und primäre Zellen mittels Trypsin von der Wachstumsunterlage gelöst, gewaschen und in einer Konzentration von $2 \cdot 10^7$ Zellen pro ml in D-PBS resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl dieser Zellsuspension unter den in Tab. 8 angegebenen Bedingungen gefärbt. Im Anschluss an die Inkubationsdauer wurden die Zellen noch einmal mit D-PBS gewaschen und 10.000 Events im FACS Calibur™ analysiert.

Tab. 8: Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper und Reaktionsbedingungen I

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Reaktionsbedingungen.</i>		
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody-unc. [200 µg/ml]	Dianova, Hamburg, BRD	1:50	45 min	RT
Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) conjugate [2 mg/ml]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	1:50	45 min	RT

3.5.2.2 Analyse der Fraktionen nach Moflo- und MACS-Separation

Die Separationsleistung der einzelnen Schritte wurde durchflusszytometrisch anhand der vor der Separation vorgenommenen CD45- und EpCAM-Markierung beurteilt.

3.5.2.3 Analyse der Fraktionen nach RoboSep-Separation

Der durchflusszytometrische CD90-Nachweis in den erhaltenen Fraktionen erfolgte durch Inkubation mit einem sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörper, welcher den während der Separation gebundenen CD90-Antikörperkomplex erkennt (siehe Tab. 9).

Tab. 9: Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper und Reaktionsbedingungen II

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Reaktionsbedingungen</i>		
Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) conjugate [2 mg/ml]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	1:25	45 min	RT

3.5.2.4 CD90/CD31- bzw. CD90/CD34-Doppelbestimmung

Die Analyse hinsichtlich einer möglichen Koexpression von CD90 und dem Gefäßendothelzellmarker CD31 wurde an peripherem Blut und Knochenmarkaspirat von Patienten mit soliden Tumoren bzw. hämatologischen Malignomen durchgeführt (Spezifikation siehe Anhang A-1, Tab. 55). Die parallel durchgeführte Analyse der CD34-Positivität sollte Informationen über deren hämatopoetischen Charakter geben.

Das für die Untersuchung herangezogene periphere Blut wurde entsprechend dem unter 3.1.2 beschriebenen Protokoll aufgearbeitet. Bei der Bearbeitung der Knochenmarkaspirate erfolgten zwei zusätzliche Waschschrte, einer mit Erythrozytenlysepuffer und einer mit D-PBS-EDTA.

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden anschließend je Ansatz $1 \cdot 10^6$ Zellen in einem Volumen von 50 µl nach dem in Tab. 10 aufgeführten Protokoll gefärbt und je 10.000 Ereignisse am FACS vermessen. Entsprechende Einzelfärbungen, Negativ- und

Isotypkontrollen (Mouse IgG1 control APC-conjugated von ImmunoTools bzw. Mouse IgG1 FITC-conjugated von Dako) wurden mitgeführt.

Tab. 10: Protokoll für die durchflusszytometrische Bestimmung CD90/CD31 bzw. CD90/CD34 doppelt positiver Zellen an Patientenmaterial

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Inkubationsdauer</i>
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody-unconjugated [200 µg/ml]	Dianova, Hamburg, BRD	1:25	45 min RT
Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) conjugate [2 mg/ml]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	1:25	45 min RT
Waschschrift mit 500 µl und Resuspendieren in 50 µl D-PBS-EDTA			
Anti-Human CD31/Mouse Monoclonal Antibody Allophycocyanin (APC)-conjugated [nicht bestimmt]	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, BRD	1:10	30 min RT
bzw.			
Anti-Human CD34/Mouse Monoclonal Antibody Allophycocyanin (APC)-conjugated [nicht bestimmt]	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, BRD	1:10	30 min RT
Waschschrift mit 500 µl und Resuspendieren in 500 µl D-PBS-EDTA			

3.6 Fluoreszenzmikroskopie

3.6.1.1 Prinzip

Ein bildgebendes Verfahren ermöglichte weiterhin eine genaue Beurteilung von Morphologie, Färbung und Vitalität der während der Separation erhaltenen Zellen.

3.6.1.2 Methodik

Die nach den einzelnen Separationsschritten erhaltenen Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht und mikroskopisch hinsichtlich ihrer Anzahl, Morphologie und EpCAM-Expression beurteilt. Weiterhin wurde die Vitalität der Zellen nach einstündiger Inkubation mit dem HOECHST-Vitalfarbstoff 33342 (10 µM, 37 °C) bestimmt.

3.7 Immunhistochemie

3.7.1 Prinzip

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Methode, die das direkte oder indirekte Detektieren von Antigenepitopen mit Hilfe eines Antikörper-gekoppelten Markers ermöglicht. Zur Verfügung stehen dafür Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme, Radionuklide oder kolloidales Gold. Bei der indirekten (Strept-)Avidin-Biotin Complex (ABC)-Methode, welche im Dako REAL™ Detection System Alkaline Phosphatase/Red, Rabbit/Mouse zum Einsatz kommt, bindet ein Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Komplex an einen biotinylierten sekundären Antikörper und setzt eine Substratlösung unter Rotfärbung um (siehe Abb. 12).

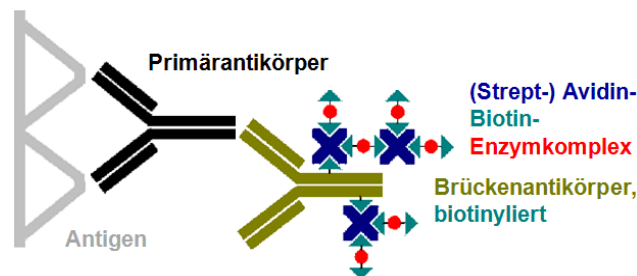


Abb. 12: Schematische Darstellung der (Strept-)Avidin-Biotin Complex (ABC)-Methode (http://www.pathologie-online.de/meth/pop-ih_6.htm)

3.7.2 Methodik

3.7.2.1 CD90-Marker Etablierung

Die fixierten, gefrorenen Zellkultur-Präparate wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und in TBS-Tween gespült. Dann wurde durch Anwendung des Dako Biotin Blocking Systems das endogene Biotin in den Zellen geblockt (10 min Avidin, Spülen, 10 min Biotin, Spülen). Die nachfolgende Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tab. 11) bzw. dem purem Antibody Diluent (Negativkontrolle) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur.

Tab. 11: Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper I

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody-unconjugated [200 µg/ml]	1:100	Dianova, Hamburg, BRD

Nach zwei Spülschritten und einem 5-minütigen Waschschrift mit TBS-Tween wurden die Präparate für 30 min mit dem sekundären biotinylierten Antikörper inkubiert (Bottle A).

Nach zwei erneuten Spülschritten und einem 5-minütigen Waschschrift erfolgte die Inkubation mit dem Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Komplex (Bottle B) für weitere 30 min. Anschließend wurden die Präparate zweimal gespült und für weitere 5 min mit TBS-Tween gewaschen. Danach erfolgte für 15 min die Umsetzung des Substrats (Chromogen) mit resultierender Rotfärbung an den Zielepitopen. Die gefärbten Präparate wurden im Anschluss noch einmal gründlich in TBS-Tween gewaschen und mit reichlich Leitungswasser gespült. Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch eine 1- bis 5-minütige Inkubation mit Hämatoxylin und darauf folgendem Bläuen der Zellkerne für 10 min in Leitungswasser. Die Präparate wurden abschließend mit destilliertem Wasser gespült und mit Glycerol-Gelatine eingedeckelt.

3.7.2.2 Analyse der Fraktionen nach RoboSep-Separation

Für die immunhistochemischen Analysen wurden Zellen der CD90-Positivfraktion mittels Zytospin auf Objektträger aufgebracht (Materialien siehe Tab. 38). Dabei wurde aufgrund der geringen Menge an Zellen auf eine Zellzahlbestimmung verzichtet und die Zellen gleichmäßig auf bis zu acht Präparate aufgeteilt. Diese wurden dann für 5 Minuten in purem kaltem Aceton fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Durchführung der Immunhistochemie erfolgte leicht modifiziert nach dem unter 3.7.2.1 beschriebenen Protokoll. Um zu vermeiden, dass der sekundäre biotinylierte Antikörper des Nachweissystems (Bottle A) neben dem zum Nachweis des Zielantigens eingesetzten Antikörper auch den während der Separation gebundenen Antikörperkomplex erkennt, kamen bereits biotinylierte Primärantikörper zum Einsatz. Ebenso wurde aufgrund des im Verhältnis zur Zellgröße sehr großen Zellkerns von Blutzellen auf eine Kernfärbung verzichtet. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 12 aufgeführt.

Tab. 12: Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper II

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>
Anti-Human ITGB1 (CD29) Mouse Monoclonal Antibody Biotin-conjugated [0,1 mg/ml]	LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA	1:100
CD44 Antigen (CD44) Mouse anti-Human Monoclonal Antibody Biotin-conjugated [1 mg/ml]	LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA	1:250
Endoglin (CD105) Mouse anti-Human Monoclonal Antibody Biotin-conjugated [1 mg/ml]	LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA	1:100
Anti Human Fibroblast Activation Protein/FAP/Sheep Polyclonal Antibody Biotin-conjugated [50 µg/ml]	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, BRD	1:100

Um sicherzustellen, dass der Nachweis der anderen Stroma- und Metastasierungsmarker wirklich an CD90-positiven Zellen erfolgt, wurde beispielhaft für CD90 und CD44 eine Doppelmarkierung durchgeführt. Da enzymatische Systeme dafür aber nur eingeschränkt geeignet sind, wurde auf einen Immunfluoreszenz-basierten Ansatz zurückgegriffen (siehe Tab. 13). Die durchgeführten Blocking- und Waschschriffe entsprechen denen der Immunhistochemie. Das abschließende Eindeckeln erfolgte mit VECTASHIELD® Mounting Medium mit DAPI.

Tab. 13: Für die Immunfluoreszenz-basierte Doppelfärbung verwendete Materialien

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Reaktionsbedingungen</i>		
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody-unconjugated [200 µg/ml]	LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA	1:50	60 min	RT
Anti-Mouse-IgG/Goat Polyclonal Antibody Cy3-conjugated [0,75 mg/ml]	Dianova, Hamburg, BRD	1:200	45 min	RT
CD44 Antigen Mouse anti-Human Monoclonal Antibody Biotin-conjugated [1 mg/ml]	LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA	1:50	60 min	RT
Streptavidin Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-conjugated [1 mg/ml]	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA	1:200	45 min	RT

3.7.2.3 CD90-Nachweis an Paraffinmaterial von Primärtumoren

Das verwendete Tumor-Paraffinmaterial (Spezifikation siehe Anhang A-1: Tab. 56, Tab. 57) wurde vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena nach Einwilligungserklärung durch die Patientinnen zur Verfügung gestellt. Für die Paraffineinbettung wurde das Gewebe zunächst für 24 h in Formalin fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (3x 70 %, 3x 100 %) für je eine Stunde entwässert. Nach drei weiteren Inkubationsschritten in Xylol (2x 1 h, ü.N.) erfolgte die Einbettung in Paraffin im Thermo Shandon Pathcentre Tissue Processor. Je nach Beschaffenheit des Präparates wurden mittels Microtom 4-6 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Für die immunhistochemische Färbung wurden diese dann zunächst mit Xylol entparaffiniert (1x 20 min, 2x 2 min) und anschließend mit purem Aceton (4x 2 min) bzw. Aceton-Wasser-Gemischen (2:1 bzw. 1:2 für je 2 min) behandelt. Die Rehydrierung der Präparate erfolgte durch dreimaliges Spülen in Leitungswasser gefolgt von zwei Spülschritten und einer 5-minütigen Inkubation in TBS-Tween. Das Antigen-Retrieval wurde mit der Dako Cytomation Target Retrieval Solution pH 9 (1x) für 15 min bei 95 °C durchgeführt. Nach Abkühlen der Schnitte für ca. eine halbe Stunde

wurden sie zunächst in Leitungswasser und anschließend in TBS-Tween gespült. Dann wurde durch Anwendung des Dako Biotin Blocking Systems das endogene Biotin in den Zellen geblockt (10 min Avidin, Spülen, 10 min Biotin, Spülen). Die nachfolgende Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tab. 14) bzw. dem puren Antibody Diluent (Negativkontrolle) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Die weitere Durchführung entspricht der unter 3.7.2.1 beschriebenen.

Tab. 14: Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper III

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>
Anti-Human CD90/Thy1 [EPR3132]/Rabbit Monoclonal Antibody-unconjugated	Abcam, Cambridge, UK	1:100

3.8 Immunfluoreszenz

3.8.1 Prinzip

Die Immunfluoreszenz ist eine diagnostische Methode aus dem Bereich der Immunhistochemie, bei der zum Nachweis von Proteinen Antikörper eingesetzt werden, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind. In Abhängigkeit von der Markierung des primären bzw. sekundären Antikörpers unterscheidet man dabei die direkte und die indirekte Immunfluoreszenz. Ein Detektionssystem für Fluoreszenz-basierte Färbungen stellt die *scan^R High-Content Screening Station for Life Science* der Firma Olympus dar.

3.8.2 Methodik

Im Anschluss an die jeweiligen Antikörper-Inkubationen wurden die Zellen noch einmal mit D-PBS gewaschen, in 150 µl D-PBS-EDTA:Formalin (1:1) aufgenommen und in eine 96-Well Platte überführt. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte nach einer Sedimentationsdauer von 1 h. Dazu wurde die Hälfte der Wellfläche im Rahmen von 100 einzelnen Messungen analysiert.

3.8.2.1 CD90-Marker Etablierung

Die Zellkulturzellen wurden mittels Trypsin von der Wachstumsunterlage gelöst, gewaschen und in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml in D-PBS resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl dieser Zellsuspension unter den angegebenen Bedingungen

(siehe Tab. 15) gefärbt. Die Gegenfärbung mit 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) diente der Unterscheidung zwischen vitalen und apoptotischen Zellen.

Tab. 15: Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper und Farbstoffe I

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Reaktionsbedingungen.</i>		
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody-unc. [200 µg/ml]	Dianova, Hamburg, BRD	1:50	45 min	RT
Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) conjugate [2 mg/ml]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	1:50	45 min	RT
7-Aminoactinomycin D (7-AAD) [10 µg/ml]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD	1:10		

3.8.2.2 Analyse der Fraktionen nach RoboSep-Separation

Mikroskopische Analysen eignen sich aufgrund der Variabilität der CD90-Expression noch besser zur Beurteilung der CD90-Positivität.

Für die parallelen Untersuchungen bezüglich einer CD90/CD34-Koexpression wurden die jeweiligen Positivfraktionen zunächst hinsichtlich Zellvitalität und -ausbeute mit 7-AAD und einem Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper analysiert (siehe Tab. 16).

Tab. 16: Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper und Farbstoffe II

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Reaktionsbedingungen</i>		
7-Aminoactinomycin D (7-AAD) [10 µg/ml]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD	1:10	45 min	RT
Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) conjugate [2 mg/ml]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	1:25		

Außerdem wurden die Zellen der CD34-Positivfraktion einer Markierung mit einem FITC-markierten Antikörper gegen CD90 und die CD90-positiven Zellen einer Färbung mit einem gegen CD34 gerichteten Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex (PerCP)-konjugierten Antikörper unterzogen (siehe Tab. 17). Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde parallel 7-AAD eingesetzt (1:10, 45 min, RT).

Quantifiziert wurden im Anschluss an die Messung vitale (7-AAD-negative), CD90-positive Zellen mit einer Koexpression von CD34.

Tab. 17: Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper und Farbstoffe III

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Reaktionsbedingungen</i>		
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody FITC-conjugated [200 µg/ml]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	1:25	45 min	RT
bzw.				
Anti-Human CD34/Mouse Monoclonal Antibody PerCP-conjugated [50 µg/ml]	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, BRD	1:5	45 min	RT

Für die parallelen Untersuchungen bezüglich einer CD90/EpCAM-Koexpression wurden die jeweiligen mittels Biotinbrücke angereicherten Positivfraktionen zunächst hinsichtlich der Zellausbeute mit 7-AAD und einem Pacific-Blue-gelabelten Streptavidin analysiert. Zum anderen wurden die Zellen der CD90-Positivfraktion einer Markierung mit einem FITC-markierten Antikörper gegen EpCAM und die EpCAM-positiven Zellen einer Färbung mit einem gegen CD90 gerichteten, FITC-konjugierten Antikörper unterzogen (siehe Tab. 18).

Tab. 18: Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper und Farbstoffe IV

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Reaktionsbedingungen</i>		
7-Aminoactinomycin D (7-AAD) [10 µg/ml]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD	1:10		
Streptavidin Pacific Blue™ conjugate [1 mg/ml]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	1:50	45 min	RT
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody FITC-conjugated [200 µg/ml]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	1:10		
bzw.				
7-Aminoactinomycin D (7-AAD) [10 µg/ml]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD	1:10		
Streptavidin Pacific Blue™ conjugate [1 mg/ml]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	1:50	45 min	RT
Anti-Human EpCAM/Mouse Monoclonal Antibody Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-conjugated	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD	1:10		

Quantifiziert wurden im Anschluss an die Messung vitale (7-AAD-negative), CD90-positive Zellen mit einer Koexpression von EpCAM bzw. EpCAM-positive Zellen mit einer Koexpression von CD90.

3.8.2.3 CD90/CD31- bzw. CD90/CD34-Doppelbestimmung

Die Analyse hinsichtlich einer möglichen Koexpression von CD90 und dem Gefäßendothelzellmarker CD31 erfolgte durchflusszytometrisch (siehe 3.5.2.4) und zur optischen Kontrolle auch mit dem scan[^]R-System. Das verwendete Patientenmaterial entspricht dem in Tab. 55 (Anhang A-1) aufgeführten. Dessen Aufarbeitung erfolgte in Anlehnung an das unter 3.1.2 beschriebene Protokoll, wobei die Knochenmarkaspirate zwei zusätzlichen Waschschritten, einem mit Erythrozytenlysepuffer und einem mit D-PBS-EDTA, unterzogen wurden. Für die Analyse einer möglichen CD90/CD31- bzw. CD90/CD34-Koexpression wurden je Ansatz $5 \cdot 10^5$ Zellen in einem Volumen von 50 μ l nach dem in Tab. 19 aufgeführten Protokoll gefärbt.

Tab. 19: Protokoll für die Mikroskop-basierte Bestimmung CD90/CD31 bzw. CD90/CD34 doppelt positiver Zellen an Patientenmaterial

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Reaktionsbedingungen</i>		
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody-unconjugated [200 μ g/ml]	Dianova, Hamburg, BRD	1:25	45 min	RT
Alexa Fluor [®] 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) conjugate [2 mg/ml]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	1:25	45 min	RT
7-Aminoactinomycin D (7-AAD) [10 μ g/ml]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD	1:10		
Waschschritt mit 500 μ l und Resuspendieren in 50 μ l D-PBS-EDTA				
Anti-Human CD31/Mouse Monoclonal Antibody Allophycocyanin (APC)-conjugated [nicht bestimmt]	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, BRD	1:10	30 min	RT
bzw.				
Anti-Human CD34/Mouse Monoclonal Antibody Allophycocyanin (APC)-conjugated [nicht bestimmt]	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, BRD	1:10	30 min	RT
Waschschritt mit 500 μ l und Resuspendieren in 50 μ l D-PBS-EDTA				

Für die Fluoreszenzdetektion wurde die Hälfte des Ansatzes zusammen mit 150 μ l D-PBS-EDTA:Formalin (1:1) in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben, wo die Zellen für 45 min sedimentierten. Im Zuge der Messung wurde die Hälfte der Wellfläche in Form von 100 Messfeldern photographisch dokumentiert. Quantifiziert wurden im Anschluss vitale (7-AAD-negative), CD90-positive Zellen mit einer Koexpression von CD31 bzw. CD34.

3.8.3 Einzelzell-RT-PCR

3.8.3.1 Prinzip

Die Methode der Einzelzell-PCR ermöglicht es, gezielt die Genexpression einzelner Zellen zu analysieren, was insbesondere vor dem Hintergrund der Tumorzell-Heterogenität einen entscheidenden Vorteil darstellt. Nach Präparation einzelner Zellen werden diese nacheinander in einem oft geringen Volumen Lyse, Reverser Transkription und PCR unterzogen. Die Verwendung von Primergemischen im Rahmen einer sog. Multiplex-PCR erlaubt zudem den parallelen Nachweis der Expression verschiedener Transkripte.

3.8.3.2 Methodik

Die Präparation der Einzelzellen erfolgte am aureka[®] System der aura optik GmbH, Jena. Dieses besteht aus einem Hochleistungs-Stereomikroskop, einem dreidimensional steuerbaren Mikromanipulator und einer speziell entwickelten Steuereinheit. Der Manipulator kann je nach Verwendung verschiedene Werkzeuge führen (siehe Abb. 13).

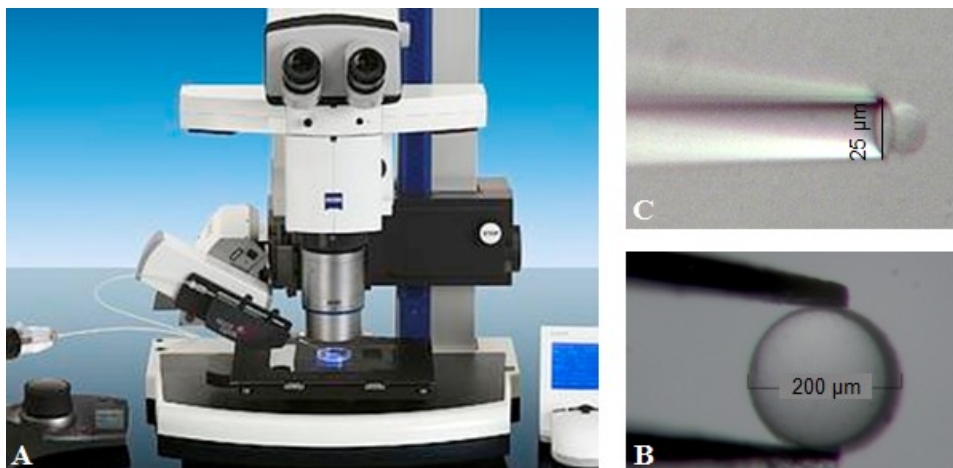


Abb. 13: Präparationsplattform aureka[®] der Firma aura optik
 (A) Hochleistungs-Stereomikroskop, in welches ein dreidimensional steuerbarer Mikromanipulator und eine speziell entwickelte Steuereinheit integriert sind. (B) Mikromanipulation mittels Kapillare, in welche die Zelle eingesaugt wird. (C) Mikromanipulation mittels Pinzette und Glaskugel, mit welcher die Zellen aufgenommen werden.

Für die Präparation mit Pinzette und Glaskugel wurden die während der Separation mit dem RoboSep[®] gewonnenen Zellen in einen Objektträger mit Vertiefung überführt, wo sie kurze Zeit sedimentierten. Anschließend wurde mit der Pinzette zunächst eine Glaskugel aufgenommen und diese dann vorsichtig in die Zellsuspension getaucht. Bei Auffinden einer Zielzelle wurde die Glaskugel genau über der Zelle langsam abgesenkt, bis diese

daran haften blieb. Im Anschluss wurden Kugel und Zelle in einem Tropfen RNase-freiem Wasser auf dem AmpliGrid AG480F-PCR-Chip abgelegt (siehe Abb. 14).



Abb. 14: AmpliGrid AG480F-PCR-Chip

Die auf dem PCR-Slide eingetrockneten Zellen wurden dann für mindestens eine Stunde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und anschließend im AmpliSpeed Slide Cycler einer weiteren thermischen Lyse unterzogen (siehe Tab. 20).

Tab. 20: Für die thermische Lyse verwendetes Programm

<i>Reaktionsschritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
Lyse	$75\text{ }^{\circ}\text{C}$	5 min
	$95\text{ }^{\circ}\text{C}$	2 min
	$20\text{ }^{\circ}\text{C}$	Hold

Für die Etablierung der Primergemische und einen Vergleich zur Expression in Einzelzellen wurde RNA aus Zellkulturzellen verwendet. Diese wurde mit dem innuPREP RNA Mini Kit der Firma Analytik Jena AG aus $5 \cdot 10^6$ Zellen entsprechend der Herstellerempfehlung isoliert. Von dieser wurden dann $\sim 100\text{ pg}$ in einem Volumen von $0,1\text{ }\mu\text{l}$ je Spot aufgebracht. Danach wurden separat $1\text{ }\mu\text{l}$ Primer [$20\text{ }\mu\text{M}$] bzw. Primergemisch [$20\text{ }\mu\text{M}$] und anschließend $0,9\text{ }\mu\text{l}$ Mastermix (siehe Tab. 21) hinzugegeben.

Tab. 21: Für die Einzelzell-RT-PCR verwendeter Reaktionsansatz

<i>Lösungen</i>	<i>Volumen für 10 Ansätze ($\Sigma 10\text{ }\mu\text{l}$)</i>
OneStep RT-PCR Buffer [5x]	$2,0\text{ }\mu\text{l}$
Q-Solution [5x]	$1,6\text{ }\mu\text{l}$
dNTP-Mix [10mM each]	$0,4\text{ }\mu\text{l}$
RT-PCR Enzymmix	$0,4\text{ }\mu\text{l}$
RNase OUT TM -Ribonuklease [40 U/ μl]	$0,2\text{ }\mu\text{l}$
RNase-freies Wasser	$5,4\text{ }\mu\text{l}$

Nach Überschichten des Reaktionsansatzes mit 4,8 µl Sealing Solution erfolgte die Amplifikation des Templates nach dem in Tab. 22 angegebenen Programm.

Tab. 22: Für die Einzelzell-RT-PCR verwendetes Programm

<i>Reaktionsschritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
initiale Denaturierung	58 °C	30 min
	95 °C	10 min
Amplifikation (40 Zyklen)	94 °C	30 sec
	60 °C	60 sec
	72 °C	60 sec
finale Elongation	72 °C	10 min

Im Anschluss wurden die Proben mit je 4 µl Ladungspuffer versetzt und auf ein Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 195 V und 0,3 A für 90 min. Die Detektion der PCR-Produkte wurde mit dem SilverXpress[®] Silver Staining Kit der Firma Invitrogen nach in Tab. 23 angegebenem Protokoll durchgeführt.

Tab. 23: Für die Silberfärbung verwendetes Protokoll

<i>Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Inkubationsdauer</i>
Sensitizing Solution	1 ml Sensitizer auf 99 ml Reinstwasser	20 min
Reinstwasser	100 ml	2x 5 min
Staining Solution	1,5 ml Stainer A und 2,5 ml Stainer B auf 46 ml Reinstwasser	30 min
Reinstwasser	100 ml	Spülen
Developing Solution	1,5 ml Developer auf 48,5 ml Reinstwasser	3-15 min
Stopping Solution	2,5 ml Stopper	10 min
Reinstwasser	100 ml	3x 5 min

3.8.4 Einzelzell-qPCR

3.8.4.1 Prinzip

Da sich über Unterschiede in der Genexpression verschiedener Zellpopulationen mittels qualitativer Analyse oftmals keine eindeutigen Aussagen treffen lassen, sind quantitative Verfahren immer öfter das Mittel der Wahl. Entsprechende, auch für die

Einzelzellanwendung geeignete Systeme sind bisher noch wenig beschrieben, weshalb man auf die Anpassung bestehender Ansätze zurückgreifen muss.

3.8.4.2 Methodik

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem FastLane Cell cDNA Kit der Firma Qiagen nach einem selbst erarbeiteten Protokoll. Die mittels Trypsin von der Wachstumsunterlage gelösten Zellkulturzellen ($1 \cdot 10^5$) wurden dazu zunächst mit 500 μ l FCW Puffer gewaschen und mit der Kapillareinheit des aureka[®] System (siehe 3.8.3.2) einzeln in 0,2 ml Reaktionsgefäße abgelegt. Die Zelllyse, die Eliminierung der genomischen DNA und die reverse Transkription erfolgten nach dem in Tab. 24 aufgeführten Protokoll. Die cDNA (10 μ l) wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tab. 24: Für die Einzelzell-cDNA-Synthese verwendetes Protokoll

<i>Reaktionsschritt</i>	<i>Komponente</i>	<i>Volumen</i>	<i>Inkubationsdauer</i>
Zelllyse	FCP-Buffer	4,0 μ l	5 min RT
Eliminierung genomischer DNA	gDNA Wipeout Buffer [7x]	1,0 μ l	5 min, 42 °C
	RNase-freies Wasser	2,0 μ l	
	Lysis Reaction	4,0 μ l	
Reverse Transkription	Quantiscript Reverse Transcriptase	0,5 μ l	30 min 42 °C
	Quantiscript RT Buffer [5x]	2,0 μ l	
	RT Primer Mix	0,5 μ l	3 min 95 °C
	gDNA Elimination Reaction	7,0 μ l	

Die anschließende qPCR wurde im Rotor-Gene Q der Firma Qiagen mit dem Rotor-Gene Multiplex PCR Kit durchgeführt. Für die Etablierung der Amplifikationsbedingungen und einen Vergleich zur Expression in Einzelzellen wurde parallel standardmäßig aus RNA umgeschriebene cDNA verwendet. Die RNA wurde mit dem innuPREP RNA Mini Kit der Firma Analytik Jena AG aus bis zu $5 \cdot 10^6$ Zellkulturzellen entsprechend der Herstellerempfehlung isoliert. Zur cDNA-Synthese wurde 1 μ g dieser RNA in 8,5 μ l destilliertem Wasser 5 min bei 65 °C erhitzt. Dazu wurden dann 11,5 μ l Reaktionsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 25) gegeben, vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer anschließenden Inkubation von 1 h bei 37 °C wurde die Reverse Transkriptase 8 min bei 95 °C inaktiviert. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Tab. 25: Für die Standard-cDNA-Synthese verwendetes Protokoll

<i>Komponente</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Volumen</i>
5x First-Strand Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	4,0 µl
DTT [0,1 M]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	2,0 µl
Primer p(dt) ₁₅ (40 µg in 25 µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD	1,0 µl
Random Primer (3 µg/µl)	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	1,0 µl
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), (je 2,5 mM)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, BRD	2,0 µl
Rnase OUT™ [40 U/µl]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	0,5 µl
m-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD	1,0 µl

Die quantitative Expressionsanalyse der untersuchten Gene erfolgte im Unterschied zur qualitativen nicht gleichzeitig in einem Multiplex-Ansatz, sondern getrennt an je 1 µl cDNA (Reaktionsansatz siehe Tab. 26).

Tab. 26: Einzelzell-qPCR-Reaktionsansatz

<i>Komponente</i>	<i>Volumen</i>
Multiplex PCR Master Mix [2x] (PCR Buffer, HotStarTaq DNA Polymerase)	12,5 µl
Primer [20 µM]	1,0 µl
Sonde [5 µM]	1,0 µl
RNase-freies Wasser	9,5 µl
cDNA-Template	1,0 µl

Das für die PCR-Reaktion verwendete Programm ist in Tab. 27 angegeben.

Tab. 27: Für die Einzelzell-qPCR verwendetes Programm

<i>Reaktionsschritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Amplifikation	95 °C	10 sec
(50 Zyklen)	52 °C	15 sec
	72 °C	25 sec

Im Anschluss an die Amplifikation erfolgte zur Einschätzung der PCR-Spezifität eine Schmelzkurvenanalyse. Dazu wurde je 1 µl SYBR-Green zum Reaktionsansatz gegeben und das PCR-Produkt nach dem in Tab. 28 aufgeführten Programm aufgeschmolzen.

Tab. 28: Für die Schmelzkurvenanalyse verwendetes Programm

<i>Programm</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
Schmelzkurve	50 °C	90 sec
	50 °C→99 °C	5 sec pro °C

Zur Verifizierung der PCR-Ergebnisse wurde im Anschluss ein Teil der Proben auf ein 1,5%iges Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel aufgetragen.

3.9 Verlaufsbeobachtungen CD90-positiver Zellen

3.9.1 Prinzip

Eine Quantifizierung CD90-positiver Zellen im Zeitverlauf sollte die Dynamik dieser Zellpopulation sowie deren Bezug zur Entwicklung der Tumorerkrankungen zeigen. Dazu wurden über den Zeitraum von einem Jahr Proben von 72 zufällig gewählten Einzelpatientinnen mit gynäkologischen Tumoren mit der bereits beschriebenen scan[^]R High-Content Screening Station for Life Science auf die Anwesenheit von zirkulierenden CD90-positiven Zellen hin untersucht (siehe Tab. 29). Parallel erfolgte die Bestimmung der Anzahl EpCAM-positiver Zellen, welche als Maß für die Anzahl an potentiellen zirkulierenden Tumorzellen gilt.

Tab. 29: Anzahl und Tumorentitäten der in die Verlaufsbeobachtungen einbezogenen Patientinnen (Patienten-spezifische Informationen siehe Anhang A-1: Tab. 58, Tab. 59)

<i>Mamma-Ca.</i>	<i>Ovarial-Ca.</i>	<i>Zervix-Ca.</i>	<i>Chorion-Ca.</i>	<i>Pankreas-Ca.</i>
65	4	1	1	1

3.9.2 Methodik

Die Quantifizierung CD90-positiver Zellen im Rahmen der Verlaufsbeobachtung wurde an Tag 2 nach Blutabnahme durchgeführt. Dazu wurde von jeder Probe 1 ml EDTA-Blut wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben aufgearbeitet und das resultierende Leukozytenpellet in 500 µl D-PBS-EDTA resuspendiert. Davon wurden dann 50 µl nach dem in Tab. 30 aufgeführten Protokoll gefärbt.

Tab. 30: Für die Bestimmung CD90-positiver Zellen im peripheren Blut verwendetes Protokoll

<i>Substanz</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Inkubationsdauer</i>
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody-unconjugated [200 µg/ml]	1:25	45 min RT
Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) conjugate [2 mg/ml]	1:25	
7-Aminoactinomycin D (7-AAD) [10 µg/ml]	1:10	45 min RT
Albumin from bovine serum (minimum 98 %) [10 %]	1:10	

Im Anschluss an die Inkubationszeiten wurden die Zellen mit 500 µl D-PBS-EDTA gewaschen und in 200 µl D-PBS-EDTA resuspendiert. Für die Fluoreszenzdetektion wurde ein Zehntel des Ansatzes zusammen mit 150 µl D-PBS-EDTA:Formalin (1:1) in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben, wo die Zellen für 45 min sedimentierten. Im Zuge der Messung wurde die Hälfte der Wellfläche in Form von 100 Messfeldern photographisch dokumentiert. Quantifiziert wurden im Anschluss vitale (7-AAD-negative), membranständig grün-gefärbte Zellen. Die Angabe der Anzahl CD90-positiver Zellen erfolgte auf 1 ml Ausgangsmaterial (~Faktor 200). Nach zunächst getesteter Doppelbestimmung wurde, aufgrund der geringen Standardabweichung (null bis vier detektierte Zellen je nach Gesamtzellzahl) und des begrenzten Materials, im weiteren Verlauf darauf verzichtet. Das Intervall zwischen den einzelnen Messungen einer Patientin variierte in Abhängigkeit vom Chemotherapieregime und Nachsorgeuntersuchungen zwischen wenigen Wochen und mehreren Monaten. Die Untersuchung der 23 gesunden Probanden wurde einmalig nach gleichem Protokoll durchgeführt.

Die parallel durchgeführte Bestimmung der Anzahl EpCAM-positiver Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Katharina Pachmann (Protokoll siehe Anhang A-2).

4 Ergebnisse

Tumor-assoziierte Fibroblasten übernehmen sowohl am Ort des Primärtumors als auch an den verschiedenen Metastasierungslokalisationen für die Tumorprogression wichtige Funktionen. Im Rahmen ihrer noch immer kontrovers diskutierten Herkunft erscheint hierfür eine zumindest vorübergehende Anwesenheit dieser Zellen in der Peripherie wahrscheinlich. Die Anzahl der dabei möglicherweise vom Primärtumor abgesiedelten oder aus dem Knochenmark mobilisierten Zellen dürfte jedoch, ebenso wie die der zirkulierenden Tumorzellen, nahe an der Nachweisgrenze liegen. Für eine nähere Charakterisierung dieser Zellpopulation bedarf es deshalb eines effektiven und schonenden Anreicherungsverfahrens. Die Separation solcher Zellen aus dem peripheren Blut wird allerdings durch verschiedene Faktoren erheblich erschwert. So ist die Zahl dieser Zellen im Vergleich zur Leukozytenzahl verschwindend gering. Die Identifizierung der Zellen mittels Oberflächenmarkern ist ungenau, besonders da es für die Zirkulation keine eindeutigen Tumor- bzw. Stroma-spezifischen Marker gibt. Schließlich sind die bisher routinemäßig eingesetzten Separationsverfahren mit dem Ziel einer vollständigen Gewinnung dieser Zellen aus einem definierten Volumen Blut aufwändig und führen zu hohen Zellverlusten. Basierend auf bisherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe sollte daher zunächst die Anreicherung verdächtiger Zellen deutlich verbessert und vereinfacht werden. Die dafür vorgesehene, mit einer CD45-Depletion kombinierte Marker-unabhängige Magnetseparation erwies sich jedoch, auch nach einigen Optimierungsversuchen, als ungeeignet. Das weiterhin erprobte, immunomagnetische Separationssystem RoboSep[®] stellte in Kombination mit dem für verschiedene Fibroblasten beschriebenen Oberflächenantigen CD90 ein effektiveres Verfahren dar. Die so aus Blutproben von Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen angereicherten Zellen wurden anschließend auf Protein- und mRNA-Ebene hinsichtlich der Expression anderer Tumor-, Stroma- und Stammzell-assoziiierter Marker näher charakterisiert. Verwendet wurden dafür immunhistochemische Methoden sowie Einzelzell-basierte PCR-Verfahren. Zur Abschätzung der Dynamik des Auftretens CD90-positiver Zellen wurden außerdem Untersuchungen an Patientenmaterial durchgeführt. Hierbei sollten Verlaufsbeobachtungen der Peripherie sowie Analysen an Primärtumormaterial Aufschluss über die klinische Relevanz und die Herkunft dieser Zellpopulation geben.

4.1 Etablierung des Separationsregimes

Das zuerst untersuchte Separationsregime sah eine CD45-Depletion mittels Hochdurchsatz-Durchflusszytometer (Moflo™ High Performance Cell Sorter) vor. Mit dieser Negativselektion sollte zur Verbesserung des Verhältnisses „gesucht:gesamt“ ein Großteil der CD45-positiven Leukozyten aus der Zellsuspension entfernt werden. Die anschließende Magnetseparation der CD45-Negativfraktion am MACS sollte aufgrund des erhöhten Membranumsatzes zur Selektion von Tumor- und unter Umständen auch Tumor-assoziierten Zellen führen. Die Ausgangssituation von schätzungsweise einer Tumorzelle auf 100.000 bis 1.000.000 Blutzellen sollte so um bis zu Faktor 100 verbessert werden.

Die Trennung der CD45-negativen von den CD45-positiven Zellen war aufgrund der Detektion zweier deutliche getrennter Punktwolken gut umsetzbar (siehe Abb. 15).

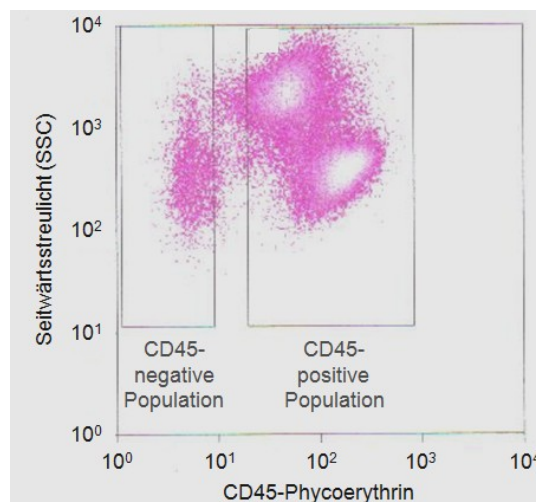


Abb. 15: Ergebnis einer CD45-Separation am Moflo™ High Performance Cell Sorter
Die Detektion zweier deutlich getrennter Punktwolken und die darauf basierende Festlegung der Separationsgates stellten eine gute Grundlage für eine spezifische CD45-Depletion dar.

Die Bestimmung der Zellzahlen im Anschluss an die Separation zeigte jedoch einen Zellverlust von 88 % und mehr. Von den erhaltenen Zellen waren rund 90 % der CD45-Positivfraktion und 10 % der CD45-Negativfraktion zuzuordnen. Die anschließende FACS-Analyse konnte die recht hohe Reinheit der erhaltenen Fraktionen bestätigen. Die parallele Erfassung der EpCAM-Expression sollte zusätzlich einen Anhaltspunkt für das Vorhandensein zirkulierender Tumorzellen liefern. Eine Detektion dieser Zellen, die potentiell ähnliche Separationseigenschaften wie die Tumor-assoziierten Stromazellen aufweisen, war jedoch nur ganz vereinzelt möglich (siehe Abb. 16) und zudem waren diese dann eher der CD45-Positivfraktion zuzuordnen.

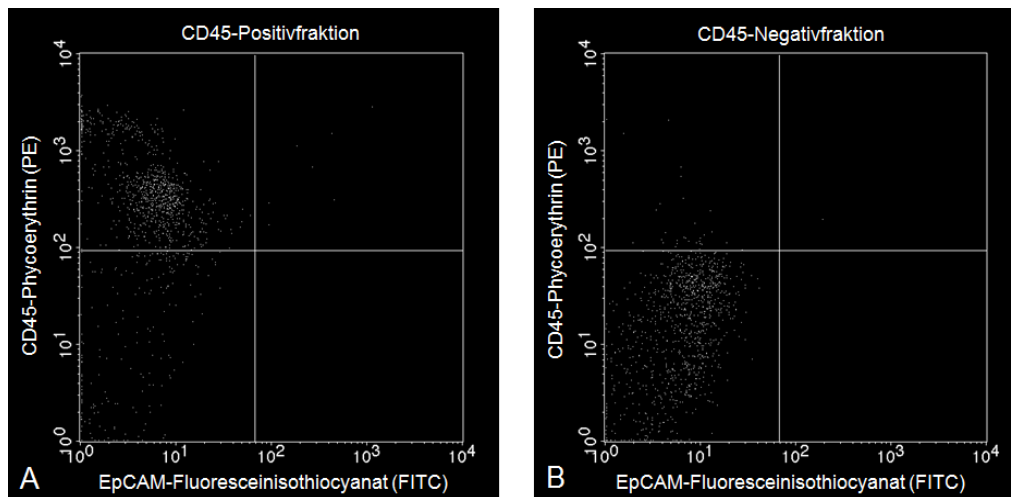


Abb. 16: FACS-Analyse der im Rahmen der CD45-Separation am MofloTM erhaltenen Fraktionen
Die durchflusszytometrischen Analysen bestätigten zum einen die recht hohe Reinheit der im Rahmen der CD45-Depletion erhaltenen Fraktionen: (A) CD45-Positivfraktion; (B) CD45-Negativfraktion. Zum anderen zeigte sich, dass potentielle zirkulierende Tumorzellen, die das epitheliale Zelladhäsions/-aktivierungs Molekül (EpCAM) exprimieren, nur ganz vereinzelt in der CD45-Positivfraktion detektierbar sind.

Die Vitalität eines Großteils der Zellen konnte per Färbung mit dem Vitalfarbstoff HOECHST 33342 bestätigt werden (siehe Abb. 17). Dabei zeigte sich außerdem, dass der Großteil der Zellen nicht einzeln, sondern in Gruppen vorlag.

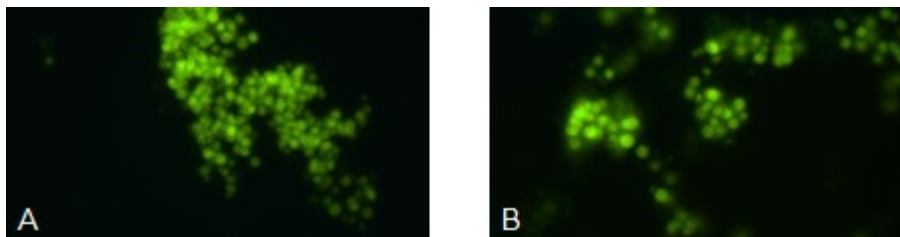


Abb. 17: Vitalfärbung der im Rahmen der CD45-Separation am MofloTM erhaltenen Fraktionen
Die Vitalität der im Rahmen der CD45-Depletion erhaltenen Zellen wurde durch Färbung mit HOECHST 33342 untersucht. Dabei spricht die aktive Aufnahme des Farbstoffs in einen Großteil der Zellen, sowohl in der CD45-Positivfraktion (A) als auch in der CD45-Negativfraktion (B), für deren Vitalität. Desweiteren zeigte sich, dass die Zellen nach der Separation zur Verklumpung neigen.

Auf weitere Analysen der CD45-Positivfraktion im Anschluss wurde verzichtet. Die CD45-Negativfraktion wurde nachfolgend mit Carboxymethyl-Dextran-umhüllten magnetischen Nanopartikeln inkubiert, welche innerhalb eines bestimmten Zeitfensters von Tumorzellen schneller internalisiert werden als von Leukozyten (Clement et al., 2006). Bei der anschließenden Separation mit dem MACS-System reduzierte sich die Gesamtzahl der erhaltenen Zellen jedoch noch einmal drastisch. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der starken Aggregation der Zellen, die das Passieren der Säule deutlich erschweren und zu einem Zurückbleiben eines Großteils der Zellen führen dürfte. Bei der Fluoreszenz-mikroskopischen Beurteilung der Zellen der so erhaltenen Positivfraktion

konnte zudem keine Anreicherung EpCAM-positiver Zellen, aber ein allgemein schlechter Vitalitätszustand der Mehrheit der Zellen festgestellt werden. Dieser ist wahrscheinlich die Folge der im Rahmen der Elution der Zellen von der Säule auftretenden Scherkräfte. Aufgrund der geringen Ausbeute der Hochdurchsatz-Durchflusszytometrie und der nur unzureichenden Anreicherung Tumor-assoziiierter Zellen wurden weitere Veränderungen des Separationsregimes, wie z.B. ein höherer Zelleinsatz und eine Änderung in der zeitlichen Abfolge der einzelnen Separationsschritte vorgenommen, die aber zu keiner Verbesserung der Situation führten. Auch die Nutzung alternativer Ansätze zu einer CD45-Depletion wie entsprechende Microbeads der Firma Miltenyi stellte keine zufriedenstellende Alternative dar. Zusammenfassend erwies sich das geplante Separationsvorgehen aufgrund der hohen Zellverluste, der geringen Ausbeute und der eingeschränkten Vitalität der Zielzellen als ungeeignet. Außerdem stellte sich der auf der Annahme ähnlicher Eigenschaften von Tumorzellen und Tumor-assoziierten Stromazellen beruhende Ansatz für eine gezielte Anreicherung als nicht spezifisch genug heraus. In einem nächsten Schritt wurde deshalb nach einem möglichst viele Fibroblastensubtypen abdeckendem Marker gesucht, um ein Zell-spezifischeres, immunmagnetisches und Säulen-unabhängiges Separationsverfahren zu testen. Der Nachweis vieler zur Identifizierung von Fibroblasten herangezogener Marker (α -glattes Muskelaktin (α -SMA), Fibroblasten-spezifisches Protein (FSP-1)) erfordert aufgrund der intrazellulären Lokalisation eine Membranpermeabilisierung. Die Separation und Einzelzellanalyse von Fibroblasten unter Erhaltung der Zellvitalität setzt somit die Verwendung eines membranständigen Markers voraus. Eine geeignete Möglichkeit hierfür stellt das extrazellulär lokalisierte Protein CD90 (Thy-1) dar. Dieses wird von Fibroblasten zahlreicher Spezies exprimiert. Beim Menschen findet man es zudem auf endothelialen Zellen und einer Subpopulation CD34-positiver Knochenmarkszellen (Übersicht: Haeryfar und Hoskin, 2004). Aktuell beschrieben wurde zudem die CD90-Expression auf Lymph- und Blutgefäßen in aktivierten Geweben wie z.B. Tumoren (Jurisic et al., 2010) sowie mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks (Dennis et al., 2007), was sich gut in den Kontext der multiplen Abstammung Tumor-assoziiierter Fibroblasten einfügt. Der Nachweis der CD90-Spezifität wurde am Zellkultursystem mittels Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und FACS-Analysen geführt (siehe Abb. 18).

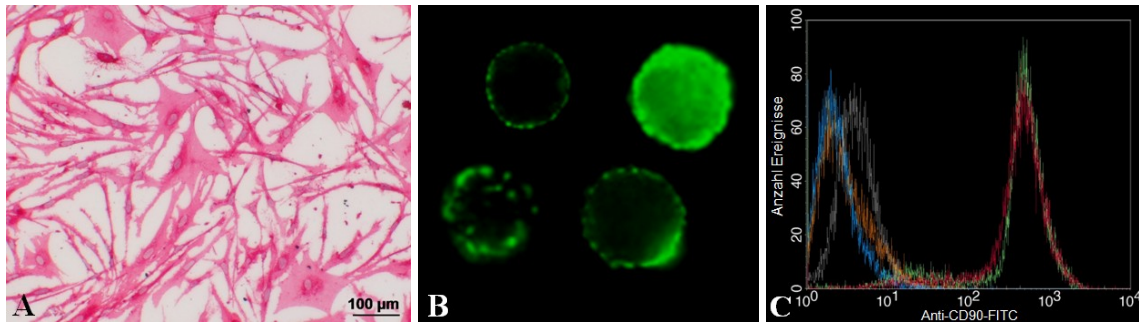


Abb. 18: CD90-Nachweis am Zellsystem

(A) Immunhistochemischer CD90-Nachweis an auf Objektträgern angezogenen primären humanen Vorhaut-Fibroblasten; (B) CD90-Nachweis mittels Immunfluoreszenz an primären humanen Vorhaut-Fibroblasten in Suspension; (C) vergleichende FACS-Analyse nach CD90 an verschiedenen Zellkulturzellen: hTERT-BJ1-immortalisierte Vorhaut-Fibroblasten (grün), primäre humane Vorhaut-Fibroblasten (rot), HBMEC-humane endotheliale Zellen der Mikrovaskulatur des Gehirns (blau), MCF-7-Mammakarzinomzellen (orange) und K562-Leukämiezellen (grau). Diese Analysen zeigen, dass es sich bei CD90 um einen spezifischen, möglicherweise Aktivierungsgrad-abhängigen Fibroblastenmarker handelt, der u.a. eine Abgrenzung von Tumorzellen ermöglicht.

Die durchgeführten Untersuchungen haben bestätigt, dass es sich bei CD90 um einen geeigneten Fibroblastenmarker handelt, der eine Unterscheidung von verschiedenen anderen Zelltypen erlaubt. Weiterhin zeigte sich eine Variabilität bezüglich der Intensität der CD90-Expression und auch der Antigenverteilung innerhalb der Fibroblastenpopulation. Auch in Mischversuchen von Leukozyten und primären humanen Vorhaut-Fibroblasten konnten letztere anhand ihrer Größe und der Expression von CD90 eindeutig identifiziert werden (siehe Abb. 19).

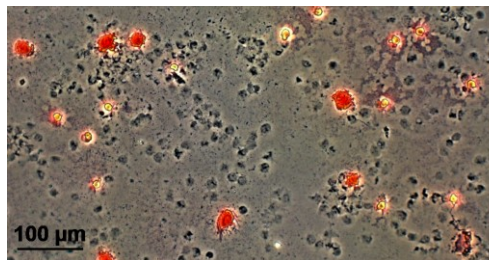


Abb. 19: Immunhistochemischer CD90-Nachweis an einer Mischpopulation aus Leukozyten und primären humanen Vorhaut-Fibroblasten (Zytospinpräparat)

Die Fibroblasten sind anhand der Expression von CD90 (rot) und auch durch ihre Größe eindeutig identifizierbar.

Die geringe Anzahl und das wahrscheinlich an bestimmte Krankheitsparameter gekoppelte Auftreten CD90-positiver Zellen verhinderten deren effizienten Nachweis in einzelnen zufällig gewählten Patientenblutproben, weshalb vorerst auf gepooltes Material zurückgegriffen wurde. Zur Separation wurden zunächst ein FITC-gekoppelter CD90-Antikörper und ein Anti-FITC-Tetramerer Antikörperkomplex eingesetzt. Auf diese Weise konnten mit dem RoboSep[®]-System CD90-positive Zellen aus gepooltem Patientenmaterial

angereichert werden (siehe Abb. 20). Die erzielte Ausbeute variierte dabei zum einen in Abhängigkeit von der Tumorentität, wobei aus peripherem Blut von Patienten mit urologischen Tumoren wie Nieren- und Harnblasenkarzinom so gut wie nie CD90-positive Zellen angereichert werden konnten. Bei gynäkologischen Tumoren gelang dies im Fall des Ovarialkarzinoms ebenfalls eher selten, bei Patientinnen mit Mammakarzinom hingegen häufig. Aber auch hier zeigten sich quantitative Unterschiede zwischen den aus Patientenblut gleicher Tumorentitäten angereicherten CD90-Positivfraktionen, was auf verschiedenste, das Vorkommen CD90-positiver Zellen beeinflussende Faktoren hindeutet. Patientenspezifische Eigenschaften wie Tumorstadium und Metastasierungsgrad, aber auch aktuelle therapeutische Interventionen könnten in diesem Fall eine entscheidende Rolle spielen.

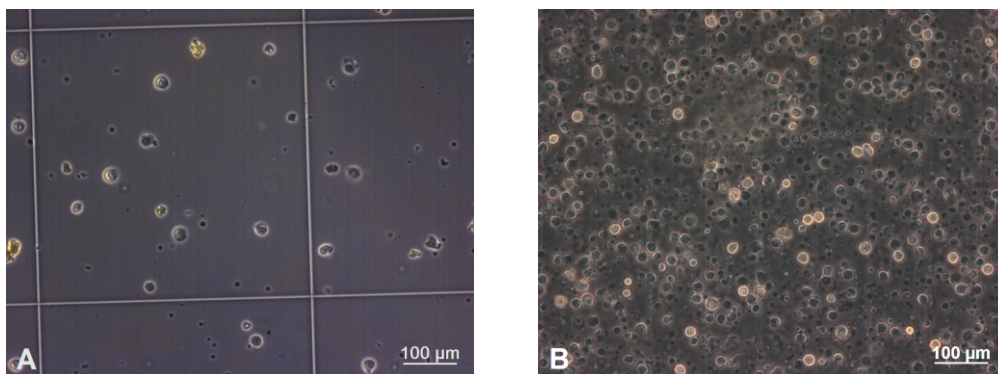


Abb. 20: Zellzahlbestimmung im Anschluss an eine indirekte RoboSep[®] Separation nach CD90

Die Anzahl der Zellen in den im Zuge der RoboSep-Separationen erhaltenen Fraktionen wurde u.a. mittels Neubauer-Kammer bestimmt, da dies parallel die Beurteilung der Zellmorphologie und -integrität erlaubt. Das hier aufgeführte Beispiel einer indirekten Separation mit einem Fluoresceinisothiocyanat-gekoppelten CD90-Antikörper zeigt, dass es in der Positivfraktion (A) zur Anreicherung von Zellen kommt, deren Zellzahl erwartungsgemäß deutlich unter der der Negativfraktion (B) liegt. Morphologisch erscheinen die Zellen beider Fraktionen intakt.

Weiterführende Analysen basierend auf der FITC-Markierung des im Zuge der Separation gebundenen FITC-gekoppelten CD90-Antikörpers waren jedoch nicht erfolgreich. Ursachen hierfür könnten eine mangelnde Stabilität und starkes Photobleichen des Komplexes im Rahmen der Probenaufarbeitung sein. Aufgrund der höheren Beständigkeit während der Separation und der größeren möglichen Methodenvielfalt im Anschluss an die Separation wurde in einem nächsten Schritt ein Tetramerer CD90-Antikörperkomplex generiert. Auch mit diesem Ansatz war es möglich, Zellen in der CD90-Positivfraktion anzureichern. Dabei konnten Ausbeute und Reinheit, vermutlich aufgrund der verbesserten Sensitivität und der Robustheit der direkten Bindung, noch einmal gesteigert werden.

Die im Anschluss an die Separationen durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen zeigten einen deutlichen Unterschied in der Fluoreszenzintensität beider Fraktionen, was ebenfalls für eine erfolgreiche Anreicherung CD90-positiver Zellen in der Positivfraktion spricht (siehe Abb. 21).

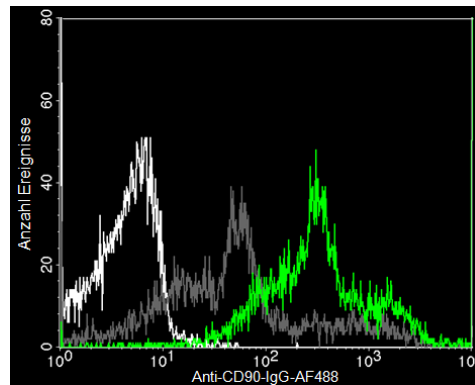


Abb. 21: FACS-Analyse der im Zuge einer direkten RoboSep[®] CD90-Separation erhaltenen Fraktionen. Der CD90-Nachweis erfolgte in diesem Fall durch Inkubation mit einem sekundären Alexa Fluor 488-gekoppelten Antikörper, welcher den während der Separation gebundenen CD90-Antikörperkomplex erkennt. Im Ergebnis zeigte sich ein deutlicher Unterschied bezüglich der detektierten Fluoreszenzintensitäten in den einzelnen Fraktionen, was für eine erfolgreiche Anreicherung spricht (weiß: ungefärbte unseparierte Zellsuspension; grau: gefärbte CD90-Negativfraktion; grün: gefärbte CD90-Positivfraktion).

Zur genaueren Beurteilung der CD90-Positivität wurden die Zellen außerdem mikroskopisch analysiert. Hierbei konnte zum einen gezeigt werden, dass die Mehrheit der Zellen auch nach der Separation noch vital war (siehe Abb. 22).

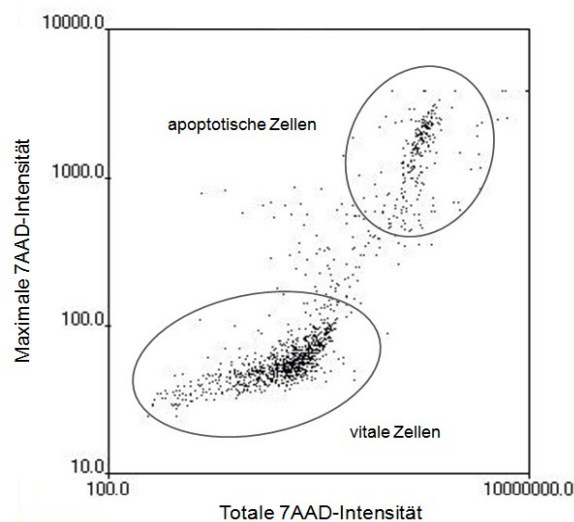


Abb. 22: Bestimmung der Zellvitalität in der Positivfraktion einer direkten RoboSep[®] Separation nach CD90. Die Zellsuspension wurde dazu mit 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) inkubiert und in 96-well Platten mithilfe des scan[^]R-Systems analysiert. Während der Farbstoff eine intakte Zellmembran nicht durchdringen kann, färbt er die Zellkerne toter Zellen rot. Im Ergebnis zeigte sich so, dass die Vitalität der Mehrheit der Zellen im Zuge der Separationsprozedur erhalten bleibt.

Bei dem verbleibenden Anteil apoptotischer Zellen (~ 5 %) sind zudem Alterungsprozesse aufgrund der Lagerung der Blutproben *ex vivo* sowie eine bereits durch chemotherapeutische Behandlungen eingeschränkte Grundvitalität der Zellen zu berücksichtigen.

Zum anderen ergaben sich bei der Fluoreszenzanalyse bei einem Großteil der Zellen der CD90-Positivfraktion ähnliche CD90-Verteilungsmuster auf der Zelloberfläche wie bei den primären humanen Vorhaut-Fibroblasten (siehe Abb. 18 und Abb. 23). Neben der unterschiedlichen, mitunter Aktivierungs-abhängigen, Expressionsstärke fällt in weiten Teilen der Zellmembran besonders die für CD90 beschriebene Antigen-Clusterung auf (Übersicht: Haeryfar und Hoskin, 2004).

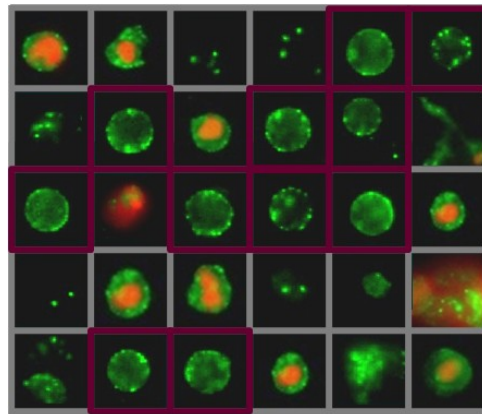


Abb. 23: Aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten angereicherte CD90-positive Zellen (scan^R Galerie) Für die Fluoreszenz-basierten Analysen wurde die Zellsuspension der CD90-Positivfraktion u.a. mit einem sekundären Alexa Fluor 488-gekoppelten Antikörper und dem Avitalfarbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) inkubiert und in 96-well Platten mithilfe des scan^R-Systems analysiert. Die detektierten Ereignisse wurden dann entsprechend ihrer Fluoreszenzeigenschaften zusammengestellt: vitale CD90-positive Zellen (grün, gerahmt); apoptotische, eventuell CD90-positive Zellen (grün, roter Zellkern-7-AAD) sowie während der Färbung auftretende Artefakte. Die geclusterte CD90-Antigenverteilung und die unterschiedlich intensive Ausprägung entsprechen den bereits bei den primären humanen Vorhaut-Fibroblasten beobachteten und für CD90 beschriebenen Mustern.

Nachdem also prinzipiell CD90-positive Zellen im peripheren Blut nachweisbar waren, galt es zu klären, ob es sich dabei um die Subpopulation CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen handelt, für die ebenfalls eine CD90-Positivität beschrieben ist (Craig et al., 1993). Dazu wurden zum einen Zellen der CD90-Positivfraktion auf die Expression von CD34 hin untersucht und zum anderen CD34-positive Zellen aus dem Blut separiert und auf eine mögliche CD90-Positivität getestet. Dabei konnte in keinem der Ansätze eine Doppelpositivität für beide Marker detektiert werden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den angereicherten CD90-positiven Zellen nicht um hämatopoetische Stammzellen handelt.

Im Verlauf der folgenden Separationsanalysen an verschiedenen Patientenpools zeigte sich eine sehr unterschiedlich große Ausbeute an CD90-positiven Zellen. Dabei fiel auf, dass eine erfolgreiche Anreicherung fast ausschließlich aus dem Blut von Patientinnen mit gynäkologischen Tumoren möglich war, wenn auch nicht bei allen. Dies unterstützt zwar zum einen die Annahme, dass es sich beim Auftreten dieser Zellen um ein Entitäts- und Patienten-spezifisches Phänomen handelt, erschwert aber zum anderen eine weitere Optimierung des Verfahrens. Um zu vermeiden, dass Patientenproben ohne CD90-positive Zellen in die Separation eingehen, wurden diese dann zunächst unsepariert auf die Anwesenheit CD90-positiver Zellen untersucht. Bei Proben mit hohen Zellzahlen ermöglichte dies dann auch die Separation individueller Patientenproben. Eine weitere Verbesserung der Ausbeute konnte zudem durch den Einsatz von Vollblut und den damit verbunden Wegfall eines Zentrifugationsschrittes erzielt werden.

Aus einer Verknüpfung dieser Separationsansätze ergab sich der letztendlich zur Separation und Charakterisierung CD90-positiver Zellen verwendete Versuchsablauf (siehe Abb. 24).

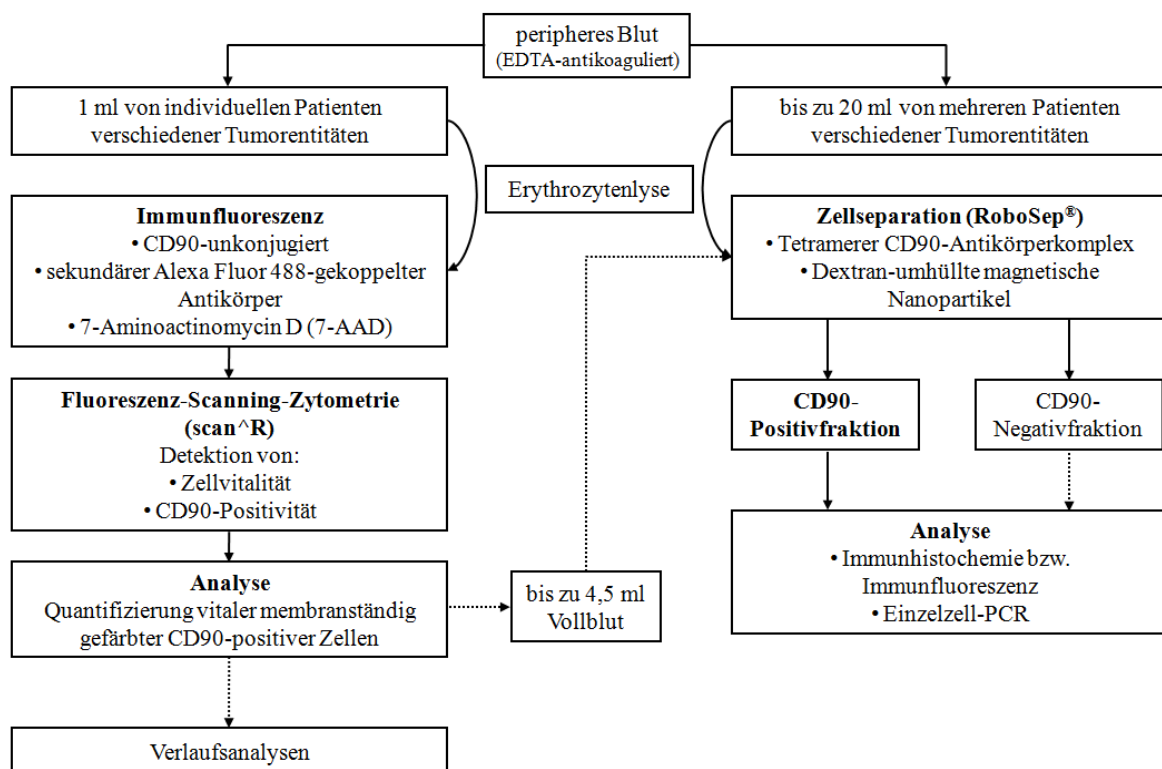


Abb. 24: Etabliertes CD90-Separationsregime und anschließende Analyseverfahren

Nach der Separation ermöglichten vielfältige weiterführende Analysen die nähere Charakterisierung der erhaltenen Zellen, was im Folgenden dargestellt werden soll.

4.2 Charakterisierung CD90-positiver Zellen

Die Untersuchungen der angereicherten Zellen auf Proteinebene erfolgten mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz. Im Rahmen der Genexpressionsanalysen kamen Einzelzell-basierte Verfahren zur Anwendung. Für die immunhistochemischen Analysen zum Nachweis weiterer Marker wurde ein Teil der im Zuge der Separation erhaltenen Zellen auf Objektträger aufgebracht. Um einen Eindruck von der tatsächlichen Anzahl der Zielzellen und der Reinheit der einzelnen Fraktionen zu bekommen, wurde zunächst ein Präparat der Färbung nach dem Separationsantigen unterzogen. Für die Mehrheit der Zellen der Positivfraktion konnte so, im Gegensatz zur Negativfraktion, die Expression des zur Separation herangezogenen Markers nachgewiesen werden (siehe Abb. 25).

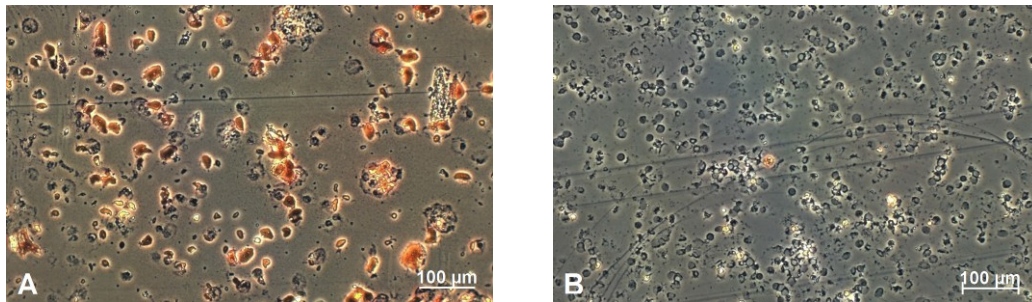


Abb. 25: Immunhistochemischer CD90-Nachweis an gepooltem, nach CD90 separiertem Patientenmaterial. Die in diesem Fall gepoolten Leukozytenfraktionen wurden mit dem RoboSep® direkt nach CD90 separiert. Teile der erhaltenen Positiv- und Negativfraktionen wurden anschließend auf Objektträger zentrifugiert und mit Aceton fixiert. Die immunhistochemische Färbung nach CD90 erfolgte in beiden Fraktionen nach Inkubation mit einem unkonjugierten CD90-Antikörper, da unsicher ist, inwieweit der Separationskomplex im Rahmen der weiteren Probenpräparation an den Zellen gebunden bleibt. Der zur Detektion eingesetzte Sekundärantikörper erkennt diesen aber ebenfalls. In der CD90-Positivfraktion (A) zeigten sich so, im Gegensatz zur CD90-Negativfraktion (B), mehrere rotgefärbte CD90-positive Ereignisse. Deren Größe und Form ist dabei wahrscheinlich auch eine Folge der Interaktionen mit dem Separationskomplex und den magnetischen Nanopartikeln in Verbindung mit dem Zentrifugationsschritt des Zytospins.

Untersucht wurde weiterhin die Expression verschiedener Tumorzell-, Stroma- und Stammzell-spezifischer Marker mithilfe von biotinylierten Antikörpern, die einen gleichzeitigen Nachweis des Separationsantikörpers umgehen (siehe Tab. 31).

Tab. 31: Mittels Immunhistochemie untersuchte Marker

Marker	Bedeutung	Literaturnachweis
CD29 Integrin beta 1 (ITGB1)	Transmembranrezeptor mit vermutlich entscheidender Beteiligung an der Vermittlung der metastatischen Disseminierung und prognostischem Potential beim invasiven Mammakarzinom	Yao et al., 2007; Kren et al., 2007

Marker	Bedeutung	Literaturnachweis
CD44 Molekül CD44 (Indische Blutgruppe)	Transmembranglykoprotein mit verschiedenen Isoformen aus der Familie der Zelladhäsionsmoleküle, welches Wachstum, Überleben, Differenzierung und Migration reguliert und damit in Prozesse der Tumorprogression und Metastasierung involviert ist	Orian-Rousseau, 2010
CD105 (Endoglin)	Transmembranglykoprotein, welches vor allem auf vaskulären Endothelzellen, aber auch auf hämatopoetischen Vorläuferzellen und Fibroblasten exprimiert wird; in soliden Tumoren beschränkt sich die Expression fast ausschließlich auf peri- und intratumorale Blutgefäße und Tumorstroma-Komponenten	Übersicht: Fonsatti et al., 2003
FAP- α Fibroblasten-Aktivierungs-Protein-alpha	Membran-integrale Serin-Proteinase, die auf der Oberfläche reaktiver stromaler Fibroblasten in 90% aller Brust-Tumoren sowie während der Wundheilung exprimiert wird	Scanlan et al., 1994
VEGFR-1 Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor (FLT1)	Rezeptor-Tyrosinkinase, die u.a. von hämatopoetischen Knochenmarks-Vorläuferzellen exprimiert wird, welche an der Initiierung der prä-metastatischen Nische beteiligt sind	Kaplan et al., 2005

Auf diese Weise konnte die Expression aller untersuchten Oberflächenantigene in unterschiedlicher Intensität und Häufigkeit in den einzelnen Proben beobachtet werden (siehe Abb. 26).

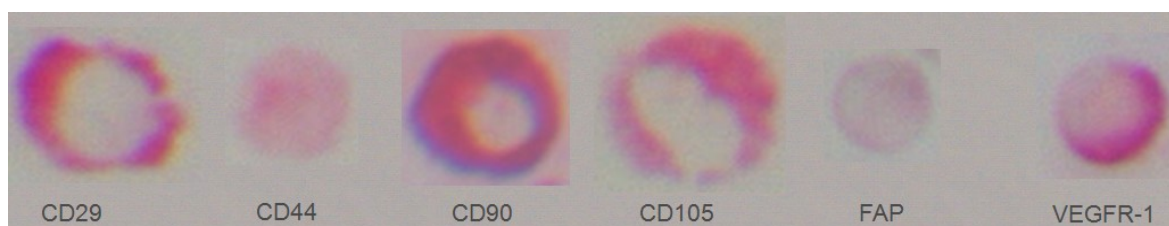


Abb. 26: Immunhistochemischer Nachweis von Tumor-, Stroma- und Stammzell-spezifischen Markern in den im Zuge der RoboSep® Separation nach CD90 erhaltenen Positivfraktionen

Die Antigendetektion erfolgte zur Umgehung des parallelen Nachweises des zur Separation eingesetzten CD90-Antikörperkomplexes mit entsprechenden biotinylierten Primärantikörpern. Auf den Einsatz eines Sekundärantikörpers konnte so verzichtet werden. Die untersuchten Marker waren in unterschiedlicher Intensität und Häufigkeit in den einzelnen Proben nachweisbar.

Aufgrund des bereits von Yang und Kollegen beschriebenen Zusammenhangs zwischen der Expression von CD90 und CD44 (Yang et al., 2008) sollte mittels Immunfluoreszenz die vermutete direkte Koexpression nachgewiesen werden. Die zugrunde liegende Doppelfärbung wurde zunächst an Fibroblasten in Zellkultur (hTERT-BJ1) etabliert. Ähnliche Ergebnisse wurden anschließend auch bei der Untersuchung aus Patientenblut angereicherter CD90-positiver Zellen erzielt. Die bereits im Vorfeld für CD90 detektierte typische Antigenclusterung war auch hier zu beobachten (siehe Abb. 27).

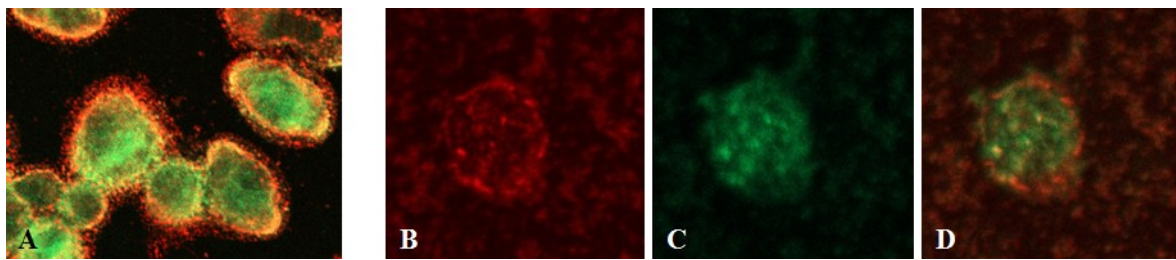


Abb. 27: Immunfluoreszenz-basierte Doppelfärbung nach CD90 und CD44

Aufgrund des bereits beschriebenen Zusammenhangs zwischen der Expression von CD90 und CD44 wurde für diese Markerkombination exemplarisch eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Dabei zeigten sowohl hTERT-BJ1 Fibroblasten (A) als auch Blutzellen, die im Zuge einer Anreicherung CD90-positiver Zellen aus dem peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen erhalten wurden (B-D), eine entsprechende Koexpression. (A) hTERT-BJ1: CD90-rot, CD44-grün, (B)-(D): Blutzelle: (B) CD90-rot, (C) CD44-grün, (D) merge

Nachdem die im Rahmen von Proteinanalysen gewonnenen Ergebnisse eine Relevanz CD90-positiver Zellen im Rahmen von Tumorprogression und Metastasierung vermuten lassen, sollten Untersuchungen bezüglich der mRNA-Expression weiterer Tumor-, Stroma- und Stammzell-assoziiierter Gene dies verifizieren. Besonders vor dem Hintergrund der Tumor- und wohl auch Stromazell-Heterogenität bringt die Methode der Einzelzell-PCR, welche eine gezielte Analyse der mRNA-Expression einzelner Zellen ermöglicht, entscheidende Vorteile mit sich. Nach Präparation einzelner Zellen werden diese nacheinander in einem oft geringen Volumen Lyse, Reverser Transkription und PCR unterzogen. Die Verwendung von Primergemischen im Rahmen einer sog. Multiplex-PCR ermöglicht zudem den parallelen Nachweis der Expression verschiedener Gene.

Aufgrund der Beschaffenheit der im Rahmen der Separation erhaltenen Positivfraktionen wurde zur Gewinnung einzelner Zellen für Genexpressionsanalysen das „Pinzetten-Glaskugel“-System verwendet. Im Gegensatz zur Kapillare, an welcher die zur Verklumpung neigenden separierten Zellen innen und außen haften bleiben können, entsteht hierbei kein Totvolumen und nicht-anvisierte Zellen werden nicht unkontrolliert

aufgenommen. Die mittels Pinzette geführte Glaskugel wurde nach Aufnahme einer Zielzelle auf einem chemisch strukturierten Objektträger der Firma Beckman Coulter abgelegt. Diese PCR-Plattform erlaubt die sensitive, effiziente und reproduzierbare Amplifikation von kleinsten mRNA-Mengen in einem minimalen Volumen. An die ausschließlich thermische Zellyse schloss sich in einem Schritt sowohl die reverse Transkription als auch die PCR-Reaktion an. Die Arbeit mit Primergemischen ermöglichte hierbei den parallelen Nachweis von bis zu sieben Genen. Deren Auftrennung erfolgte schließlich in einem Polyacrylamid-Harnstoffgel gefolgt von der besonders sensitiven, auch für Proteine verwendeten Silberfärbung.

Zunächst wurde ausgeschlossen, dass die Anwesenheit der 100-200 µm großen Glaskugeln die PCR-Reaktion inhibiert bzw. zur Bildung unspezifischer Produkte führt. Anschließend wurde die Expression verschiedener Tumorzell-, Stroma- und Stammzell-spezifischer Gene (siehe Tab. 32) mithilfe von zwei verschiedenen Primergemischen untersucht.

Tab. 32: Mittels Einzelzell-RT-PCR untersuchte Gene

<i>Gen</i>	<i>Bedeutung</i>	<i>Literaturnachweis</i>
α -SMA alpha-glattes Muskelaktin (alpha-Aktin-2)	Mitglied der Aktinfamilie, das als Strukturprotein der glatten Muskulatur fungiert; gilt heute als der am häufigsten zur Identifizierung von Myofibroblasten herangezogene Marker	Lazard et al., 1993; Übersicht: Powell et al., 1999
CD90 (Thy-1)	Oberflächenantigen, welches von neuronalen Zellen, verschiedenen Fibroblasten und Gefäßen sowie von endothelialen Zellen, glatten Muskelzellen und einer Subpopulation CD34-positiver Knochenmarkszellen exprimiert wird	Übersicht: Haeryfar und Hoskin, 2004; Jurisic et al. 2010
EpCAM epitheliales Zelladhäsions/- aktivierungs Molekül	Tumor-assoziiertes Antigen, welches von einer Vielfalt humaner Adeno- und Plattenepithelkarzinome, aber auch von einer Reihe normaler Epithelien exprimiert wird	Übersicht: Baeuerle und Gires, 2007
FAP- α Fibroblasten- Aktivierungs- Protein-alpha	Membran-integrale Serin-Proteinase, die auf der Oberfläche reaktiver stromaler Fibroblasten in 90% aller Brust-Tumoren sowie während der Wundheilung exprimiert wird	Scanlan et al., 1994
Gremlin 1	Mitglied der Familie der Knochen-morphogenesefaktor (BMP)-Antagonisten, das u.a. von stromalen Zellen verschiedener humaner Karzinome exprimiert wird und die Tumorzellproliferation fördern kann	Sneddon et al., 2006

<i>Gen</i>	<i>Bedeutung</i>	<i>Literaturnachweis</i>
HER-2/neu humaner epidermaler Wachstumsfaktor- Rezeptor 2 (c-erbB-2)	Onkogen, welches für einen Transmembran-Tyrosinkinase-Rezeptor kodiert und dessen Genamplifikation oder Proteinüberexpression für einen Teil invasiver Brusttumoren beschrieben und prognostisch relevant ist	Stern et al., 1986; Übersicht: Ross et al, 2003
RPL13A 60S Ribosomales Protein L13A (rb 23- kDa)	ribosomales Protein der 60S Untereinheit, welches u.a. für mesenchymale Stammzellen als geeigneter interner Standard für Genexpressionsanalysen beschrieben ist	Jesnowski, 2002; Curtis et al., 2010
SCF Stammzellfaktor (KIT-Ligand)	hämatopoetisches Zytokin, welches über die Wechselwirkung mit seinem Rezeptor c-kit biologische Effekte wie die Proliferation, Differenzierung und Mobilisierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen vermittelt; Fibroblasten und endotheliale Zellen produzieren SCF konstitutiv	Broudy, 1997
SDF-1 Stromazell- abgeleiteter Faktor-1 (CXCL12)	Chemokin, welches im Rahmen seiner Wechselwirkung mit dem Rezeptor CXCR4 an Tumorprogression, Angiogenese und Metastasierung beteiligt ist	Teicher und Fricker, 2010
VEGFR-1 Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor- Rezeptor (FLT1)	Rezeptor-Tyrosinkinase, die u.a. von hämatopoetischen Knochenmarks-Vorläuferzellen exprimiert wird, welche an der Initiierung der prä-metastatischen Nische beteiligt sind	Kaplan et al., 2005
Vimentin	Mitglied der Intermediärfilament-Familie, welches als Marker für die mesenchymale Transition von epithelialen Zellen fungiert; die im Tumorstroma detektierte Expression könnte auf dessen Umbau im Rahmen von Metastasierungsereignissen hindeuten, welcher das Herauslösen der Tumorzellen erleichtert	Dutsch-Wicherek, 2010

Die Expression dieser Marker wurden zunächst an aus Zellkulturzellen isolierter RNA verschiedener Fibroblasten und der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 getestet. In die Auswertung gingen all die Proben ein, für die ein PCR-Produkt des Referenzgens RPL13A nachgewiesen werden konnte. Die so quantifizierte PCR-Effizienz lag zwischen 68 % und 85 %, was sich im Bereich der für diese Methode beschriebenen Sensitivität bewegt (siehe Abb. 28).

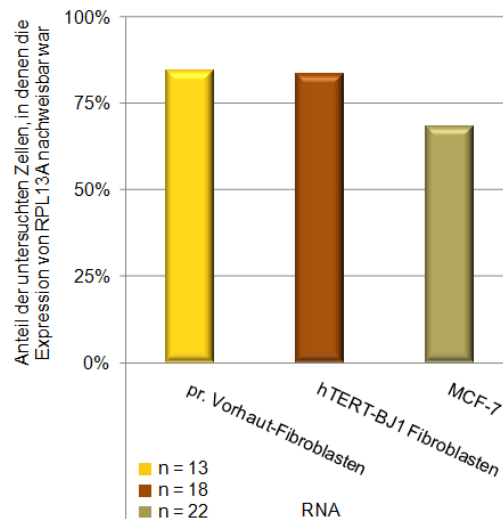


Abb. 28: Expressionshäufigkeit von RPL13A in mRNA-Proben verschiedener Zellkulturzelllinien

Das 60S Ribosomale Protein L13A (RPL13A) wurde im Rahmen der qualitativen Einzelzell-PCR als Referenzgen verwendet. Nur die Proben, in denen ein entsprechendes PCR-Produkt nachweisbar war, gingen in die Auswertung ein. Die so quantifizierte PCR-Effizienz lag bei beiden Fibroblastenzelllinien bei rund 85 % und bei der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 bei 68 %.

Nach Optimierung der Primer und der PCR-Bedingungen war es möglich, bis zu sieben PCR-Produkte in einem Reaktionsansatz zu generieren und damit die Expression von sieben verschiedenen Genen an einem Template zu untersuchen. Die Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese gefolgt von der Silberfärbung erwies sich aufgrund der hohen Sensitivität als geeignetes Verfahren zu deren simultaner Detektion (siehe Abb. 29).

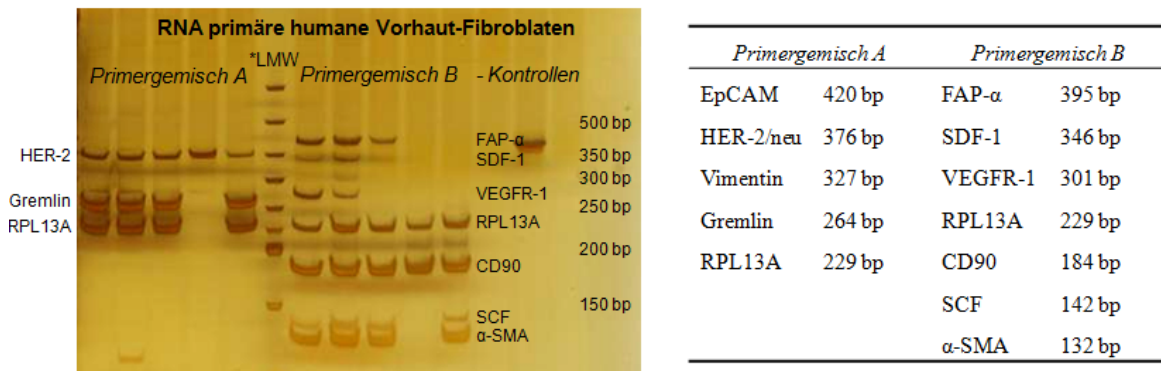


Abb. 29: Auftrennung und Nachweis der Produkte der qualitativen Einzelzell-PCR

Zur Etablierung der Primergemische wurde die Expression ausgewählter Tumorzell-, Stroma- und Stammzell-spezifischer Gene zunächst an aus $5 \cdot 10^6$ Zellkulturzellen isolierter RNA untersucht. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung detektiert. Die hohe Sensitivität dieser Methode erlaubte den parallelen Nachweis der Expression von bis zu sieben Genen.

α-SMA (alpha-glattes Muskelaktin); EpCAM (epitheliales Zelladhäsions/-aktivierungs Molekül); FAP-α (Fibroblasten-Aktivierungs-Protein-alpha); HER-2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2); RPL13A (60S Ribosomales Protein L13A); SCF (Stammzellfaktor); SDF-1 (Stromazell-abgeleiteter Faktor-1); VEGFR-1 (Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor 1)

Bei der Untersuchung der Expression der verschiedenen Tumorzell-, Stroma- und Stammzell-spezifischen Gene in den mRNA-Templates zeigten sich zum einen Unterschiede zwischen den Tumorzellen und den Fibroblasten bezüglich der Expression von Gremlin, CD90 und α -SMA. Diese Gene wurden von nahezu allen Fibroblastenzellen, aber nicht oder nur in geringem Maße von den MCF-7-Zellen exprimiert. Das epitheliale Zelladhäsions/-aktivierungs Molekül (EpCAM) hingegen konnte nur in den Tumorzellen nachgewiesen werden. Auch zwischen den verschiedenen Fibroblasten zeigten sich z.T. deutliche Unterschiede. So war die Expression des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (HER-2/neu), des Fibroblasten-Aktivierungs-Proteins-alpha (FAP- α) und des Stammzellfaktors (SCF) fast ausschließlich in den primären Vorhaut-Fibroblasten möglich (siehe Abb. 30). Dies schafft die Voraussetzung für eine differentielle Charakterisierung verschiedener Fibroblastenpopulationen sowie deren Abgrenzung zur Tumorzellpopulation.

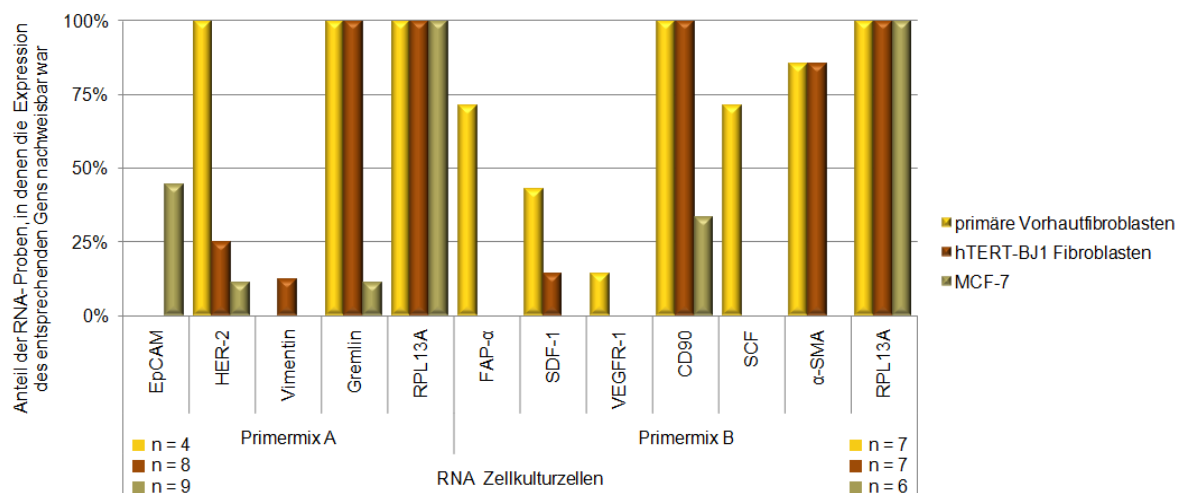


Abb. 30: Expressionshäufigkeit ausgewählter Tumorzell-, Stroma- und Stammzell-spezifischer Gene in mRNA-Templates verschiedener Zellkulturzellen

Zur Etablierung der Primergemische wurde die Expression ausgewählter Tumorzell-, Stroma- und Stammzell-spezifischer Gene zunächst an aus Zellkulturzellen isolierter RNA untersucht. Dabei unterschieden sich die Fibroblasten von den Tumorzellen vor allem in der Expression von EpCAM, Gremlin, CD90 und α -SMA. Aber auch zwischen den primären und den immortalisierten Fibroblasten (hTERT-BJ1) zeigten sich Unterschiede bezüglich der Expressionshäufigkeit von HER-2, FAP- α und SCF.

α -SMA (alpha-glattes Muskelaktin); EpCAM (epitheliales Zelladhäsions/-aktivierungs Molekül); FAP- α (Fibroblasten-Aktivierungs-Protein-alpha); HER-2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2); RPL13A (60S Ribosomales Protein L13A); SCF (Stammzellfaktor); SDF-1 (Stromazell-abgeleiteter Faktor-1); VEGFR-1 (Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor 1)

Da bereits bei der Untersuchung von mRNA-Templates, die aus rund $5 \cdot 10^6$ Zellen gewonnen wurden, Unterschiede in der Expression der untersuchten Gene auftraten, sollte der direkte Vergleich mit einzelnen Zellkulturzellen klären, ob möglicherweise wenige und

Intensitäts-schwache Signale vor einem hohen Hintergrund nicht detektierbar sind (siehe Abb. 31).

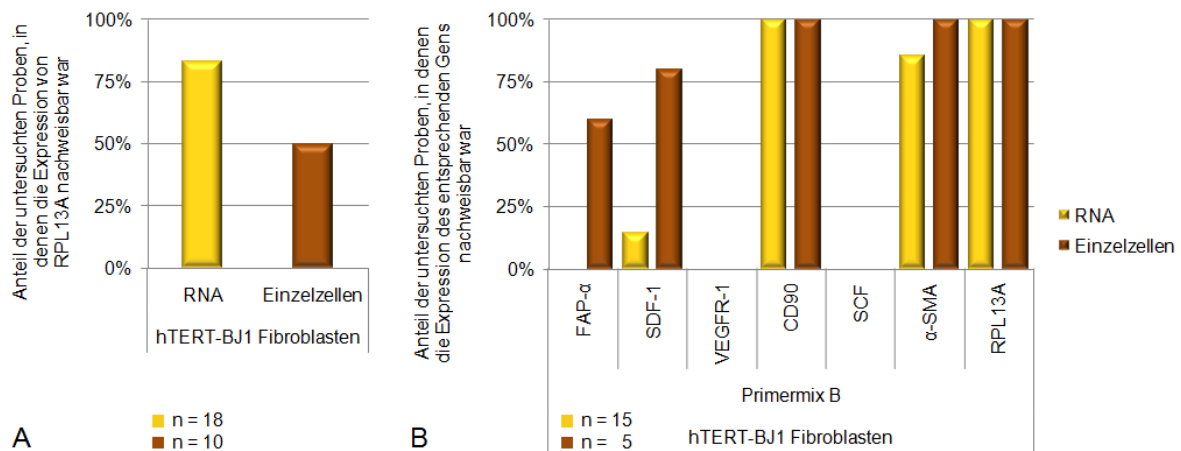


Abb. 31: Expressionshäufigkeit ausgewählter Stroma- und Stammzell-spezifischer Gene in mRNA-Templates und isolierten Einzelzellen der hTERT-BJ1 Fibroblasten

Ein Vergleich zwischen mRNA-Templates, die aus rund $5 \cdot 10^6$ Zellen gewonnen wurden, und isolierten Einzelzellen zeigte im Fall der immortalisierten Fibroblasten (hTERT-BJ1) eine niedrigere PCR-Effizienz bei der Analyse der Einzelzellen (A). Auf der anderen Seite lag die Expressionshäufigkeit von FAP- α und SDF-1 in den Einzelzellen deutlich über der in den mRNA-Templates detektierten. Ein Nachweis der Expression von SCF und VEGFR-1 war hingegen in keiner der beiden Templateformen möglich (B).

α -SMA (alpha-glattes Muskelaktin); FAP- α (Fibroblasten-Aktivierungs-Protein-alpha); RPL13A (60S Ribosomales Protein L13A); SCF (Stammzellfaktor; SDF-1 (Stromazell-abgeleiteter Faktor-1); VEGFR-1 (Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor 1)

Dabei fiel zum einen auf, dass die PCR-Effizienz im Fall der Einzelzellen mit rund 50 % deutlich unter der der mRNA-Templates lag. Dies macht deutlich, welche Bedeutung sowohl der Zellintegrität als auch der initialen Zelllyse zukommt. Weiterhin zeigte sich, dass FAP- α und SDF-1, deren Expression am mRNA-Template der hTERT-BJ1 Fibroblasten nicht oder nur selten nachweisbar war, in 60 % bzw. 80 % der isolierten Einzelzellen detektiert werden konnte. Ein Nachweis der Expression von SCF und VEGFR-1 war hingegen weder in den mRNA-Proben noch in den Einzelzellen möglich. Dies macht noch einmal deutlich, wie wichtig Einzelzell-basierte Nachweismethoden selbst bei der Untersuchung homogener, besonders aber bei der Analyse heterogener Zellpopulationen sind.

Bei den im Anschluss durchgeführten Analysen an aus dem peripheren Blut isolierten Zellen zeigte sich, basierend auf der Expression des Referenzgens RPL13A, eine nahezu identische PCR-Effizienz für die untersuchten CD90-positiven und CD90-negativen Zellen (siehe Abb. 32). Diese lag mit rund 55 % in einem ähnlichen Bereich wie die der isolierten Einzelzellen der Zellkulturzelllinie hTERT-BJ1 (siehe Abb. 31).

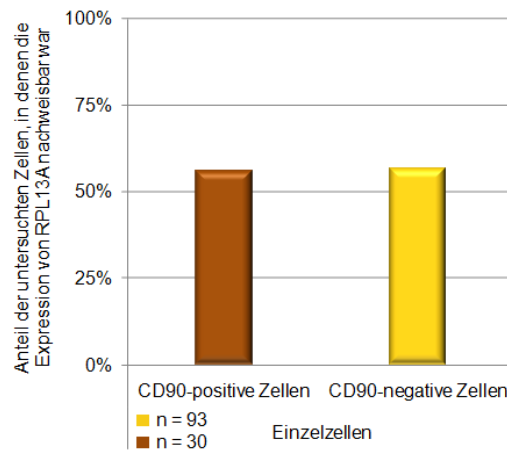


Abb. 32: Expressionshäufigkeit von RPL13A in aus dem peripheren Blut isolierten CD90-positiven und CD90-negativen Zellen

Das 60S Ribosomale Protein L13A (RPL13A) wurde im Rahmen der qualitativen Einzelzell-PCR als Referenzgen verwendet. Nur die Proben, in denen ein entsprechendes PCR-Produkt nachweisbar war, gingen in die Auswertung ein. Die so quantifizierte PCR-Effizienz lag bei 56 % für die CD90-positiven Zellen bzw. 57 % für die CD90-negativen Zellen und damit ähnlich hoch wie die der isolierten Zellkulturzellen.

Bezüglich der Expression der untersuchten Tumorzell-, Stroma- und Stammzell-spezifischen Gene zeigte sich auch in den analysierten Blutzellen eine stabile Expression von Gremlin, CD90 und SCF. Eine Expression der Gene FAP- α , SDF-1 und α -SMA konnte nicht nachgewiesen werden. Unerwartet gering war dabei der Unterschied in den Expressionshäufigkeiten zwischen CD90-positiven und -negativen Zellen (siehe Abb. 33).

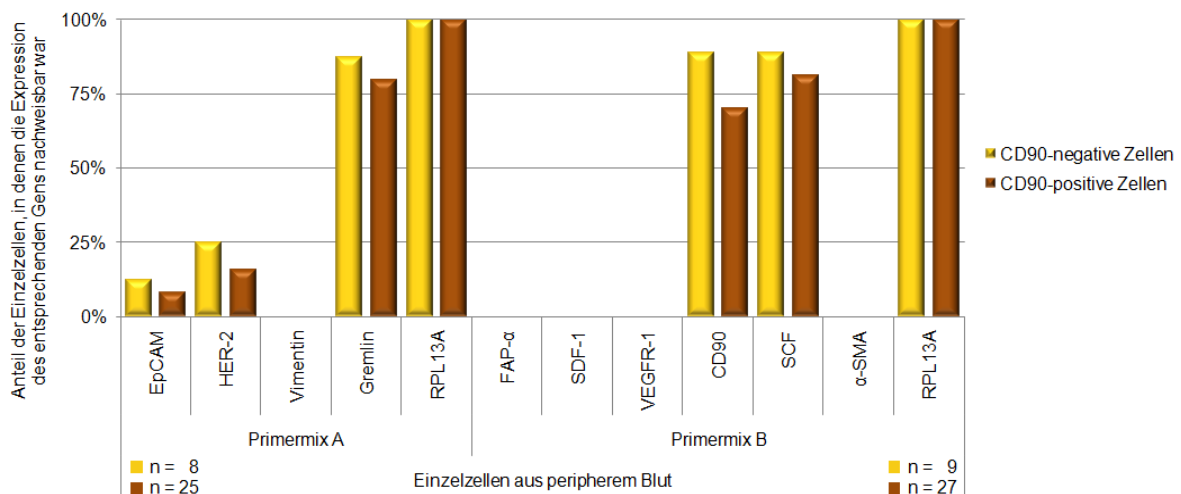


Abb. 33: Expressionshäufigkeit ausgewählter Tumorzell-, Stroma- und Stammzell-spezifischer Gene in aus dem peripheren Blut isolierten CD90-positiven und CD90-negativen Zellen

Untersucht wurde die Expression ausgewählter Tumorzell-, Stroma- und Stammzell-spezifischer Gene an aus dem peripheren Blut isolierten CD90-positiven und CD90-negativen Zellen. Im Ergebnis zeigte sich eine stabile Expression von Gremlin, CD90 und SCF. Eine Expression der Gene FAP- α , SDF-1 und α -SMA konnte nicht nachgewiesen werden. Die Expressionshäufigkeit variiert dabei nur unwesentlich zwischen den beiden Zellpopulationen.

α -SMA (alpha-glattes Muskelaktin); EpCAM (epitheliales Zelladhäsions/-aktivierungs Molekül); FAP- α (Fibroblasten-Aktivierungs-Protein-alpha); HER-2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2); RPL13A (60S Ribosomales Protein L13A); SCF (Stammzellfaktor); SDF-1 (Stromazell-abgeleiteter Faktor-1); VEGFR-1 (Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor 1)

Diese Ergebnisse der Einzelzell-RT-PCR haben gezeigt, dass eine qualitative Analyse der gewählten Gene zur näheren Charakterisierung und vor allem zur Unterscheidung zirkulierender CD90-positiver Zellen von anderen Blutzellen nicht ausreicht. Besonders die im Zuge der Zirkulation und Milieuänderung notwendigen Anpassungen dürften mit vielfältigen Änderungen in der Genexpression einhergehen. Dies hat zur Folge, dass Markerprofile für ursprünglich im Gewebe lokalisierte Zellen nur schwer oder gar nicht abzuschätzen sind. Dementsprechend könnten quantitative Ansätze helfen, auch kleinste, möglicherweise funktionell relevante Unterschiede in der Genexpression zu detektieren. Solche, auch für die Einzelzellanwendung geeignete Verfahren sind bisher jedoch noch wenig beschrieben, weshalb man auf die Anpassung bestehender Ansätze zurückgreifen muss. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein auf cDNA-Bibliotheken basierender Ansatz getestet (Taniguchi et al., 2009). Hierbei handelt es sich um eine PCR-Methode, bei der cDNA-Moleküle an magnetische Kügelchen gebunden werden und wiederholt als Template dienen, um die Expression mehrerer Gene an einer Zelle zu untersuchen. Neben einer sehr aufwendigen Durchführung war vor allem der Verlust im Rahmen der Magnet-basierten Rückgewinnung ein entscheidender Nachteil dieses Verfahrens. Alternativ wurde das FastLane Cell cDNA-Kit der Firma Qiagen auf seine Verwendungsmöglichkeit im Rahmen Einzelzell-basierter Ansätze hin untersucht. Die hier zur Anwendung kommende Technologie ermöglicht in vier Schritten eine direkte cDNA-Präparation aus kultivierten Zellen, welche im Anschluss auch in kleinsten Mengen detektierbar sein soll. Das vom Hersteller für den Einsatz von bis zu $1 \cdot 10^5$ Zellen vorgesehene Protokoll wurde für die Arbeit mit Einzelzellen schrittweise an ein minimales Endvolumen von 10 µl angepasst. Dies ermöglichte die getrennte Expressionsanalyse von bis zu zehn Genen an einer einzelnen Zelle. Zur Etablierung des Systems wurde die Expression von CD90 und FAP- α in isolierten Einzelzellen verschiedener Zellkulturen analysiert. Als Referenzgene wurden zunächst EEF1G (Eukaryotischer Elongationsfaktor 1 gamma), welches im Rahmen der cDNA-Bibliothek-basierten Methode zum Einsatz kam, bzw. RPL13A (60S Ribosomales Protein L13A), welches bei der qualitativen RT-PCR verwendet wurde, getestet. Während RPL13A, welches u.a. für mesenchymale Stammzellen als geeigneter interner Standard für Genexpressionsanalysen beschrieben ist (Curtis et al., 2010), zumindest von einem Teil der Zellen relativ stabil exprimiert wurde, konnte die Expression von EEF1G nicht reproduzierbar nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde weiterhin GUS-B auf seine Eignung als Referenzgen für diesen Versuchsansatz hin untersucht. Dieses, für die

beta- Glukuronidase kodierende Gen weist keine Pseudogene auf und zeigt nur eine relativ geringe Variabilität seiner Expression bei verschiedenen Geweben sowie in Zellen solider Tumoren und hämatoonkologischer Malignomen (Aerts et al., 2004; Rubie et al., 2005; Beillard et al., 2003). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die medianen mRNA-Level von GUS-B in gesunden Brustgeweben und Brusttumoren nur sehr geringfügig voneinander unterscheiden (Trigarico et al., 2002). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Expression von GUS-B in mehr als 80 % aller präparierten Zellen detektiert werden, was es zum geeignetsten der untersuchten Referenzgene machte. Allgemein war bei der Analyse der aus Einzelzellen gewonnenen cDNA die Detektion spezifischer Fluoreszenzsignale aufgrund der minimalen Templatemenge erst nach mehr als 30 Zyklen, aber prinzipiell für alle untersuchten Gene möglich (siehe Abb. 34 bis Abb. 36).

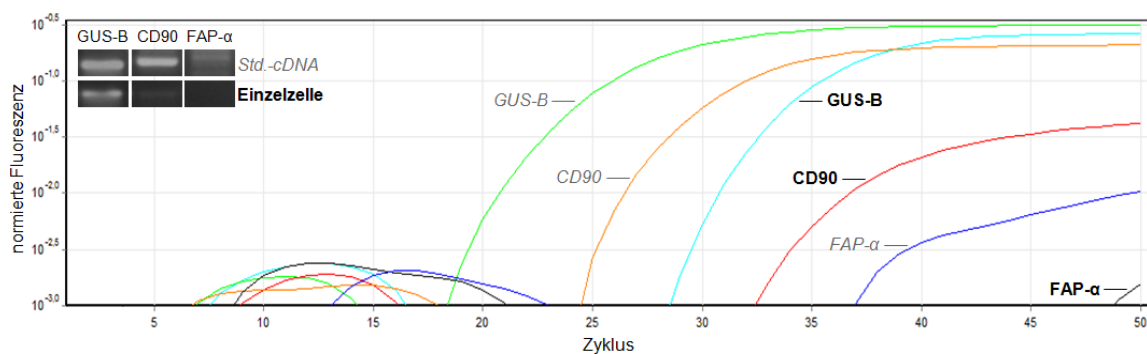


Abb. 34: Quantitativer Expressionsnachweis von CD90 und FAP- α in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Standardmäßig aus Zellkulturzellen gewonnene cDNA (grau) und aus einer einzelnen Zelle isolierte cDNA (fett) wurden quantitativ auf die Expression des Referenzgens GUS-B bzw. der Fibroblasten-assoziierten Gene CD90 und FAP- α untersucht. Während GUS-B und CD90 in beiden Templateformen nachweisbar waren, lag die Expression von FAP- α stets nahe bzw. für die Einzelzellen unter der Nachweisgrenze. Eine anschließende qualitative Beurteilung mittels Agarosegelelektrophorese bestätigte diese Ergebnisse.

FAP- α (Fibroblasten-Aktivierungs-Protein-alpha); GUS-B (beta-Glukuronidase); Std. (Standard)

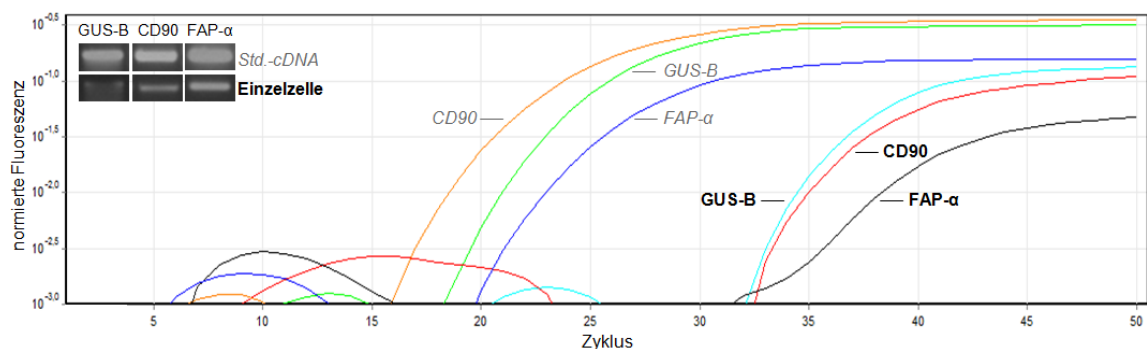


Abb. 35: Quantitativer Expressionsnachweis von CD90 und FAP- α in hTERT-BJ1 Fibroblasten. Standardmäßig aus Zellkulturzellen gewonnene cDNA (grau) bzw. aus einer einzelnen Zelle isolierte cDNA (fett) wurden quantitativ auf die Expression des Referenzgens GUS-B bzw. der Fibroblasten-assoziierten Gene CD90 und FAP- α untersucht. Hierbei konnte die Expression der untersuchten Gene sowohl an Standard-cDNA als auch in einem Teil der einzeln präparierten immortalisierten Fibroblasten nachgewiesen werden. Eine anschließende qualitative Beurteilung mittels Agarosegelelektrophorese bestätigte diese Ergebnisse. FAP- α (Fibroblasten-Aktivierungs-Protein-alpha); GUS-B (beta-Glukuronidase); Std. (Standard)

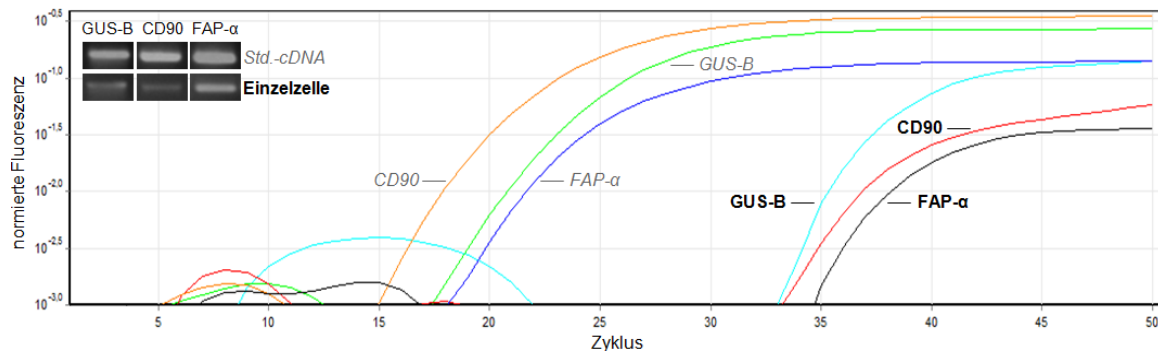


Abb. 36: Quantitativer Expressionsnachweis von CD90 und FAP- α in primären Vorhaut-Fibroblasten
Standardmäßig aus Zellkulturzellen gewonnene cDNA (grau) bzw. aus einer einzelnen Zelle isolierte cDNA (fett) wurden quantitativ auf die Expression des Referenzgens GUS-B bzw. der Fibroblasten-assoziierten Gene CD90 und FAP- α untersucht. Auch bei den primären Fibroblasten konnte die Expression der untersuchten Gene an Standard-cDNA und einem Teil der Einzelzellen nachgewiesen werden. Eine anschließende qualitative Beurteilung mittels Agarosegelelektrophorese bestätigte diese Ergebnisse.

FAP- α (Fibroblasten-Aktivierungs-Protein-alpha); GUS-B (beta-Glukuronidase); Std. (Standard)

Bereits anhand der Agarosegelelektrophorese war so eine deutliche qualitative Unterscheidung zwischen der Brustkrebszelllinie MCF-7 sowie den primären und den immortalisierten Vorhaut-Fibroblasten möglich. Quantitativ betrachtet lag die Transkriptmenge von CD90 bei der Mehrheit der primären Fibroblasten (75 %), einem Viertel der immortalisierten Fibroblasten (hTERT-BJ1) und rund 8 % der MCF-7-Zellen über der des Referenzgens GUS-B oder im gleichen Bereich. Auch bei FAP- α war dies zumindest in rund 17 % der analysierten primären Fibroblasten der Fall. Aus diesem Grund wurden im Gegensatz zur qualitativen RT-PCR alle Zellen in die Auswertung einbezogen, für die die Expression von mindestens einem der untersuchten Gene nachweisbar war. So zeigte sich eine Expression von CD90 in rund 38 % aller MCF-7-Zellen und 75 % bzw. 83 % der Fibroblasten. FAP- α hingegen konnte in keiner der MCF-7-Zellen nachgewiesen werden und auch zwischen den verschiedenen Fibroblasten zeigte sich mit 75 % für die primären und 25 % für die immortalisierten ein deutlicher Unterschied in der Häufigkeit der FAP-exprimierenden Zellen.

Mit diesem quantitativen Ansatz war es also nicht nur möglich, CD90- und FAP-exprimierende von nicht-exprimierenden Zellen zu unterscheiden, sondern auch eine graduelle Einteilung vorzunehmen, die es ermöglicht, innerhalb gleicher Zelltypen zu unterscheiden. Die mit dieser Methode erreichte Sensitivität und Effizienz bewegt sich trotz deutlich geringerem Templateinsatz im Bereich der Einzelzell-RT-PCR. Dies schafft die Voraussetzung, zur vergleichenden Analyse von CD90-positiven und CD90-negativen Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten.

4.3 Quantitativer CD90-Nachweis an Patientenmaterial

Nachdem im Rahmen der Separation gezeigt werden konnte, dass die Anzahl CD90-positiver Zellen patientenabhängig zum Teil stark variiert, sollte eine Quantifizierung der Zellen auch an zufällig gewählten Einzelpatienten durchgeführt werden. Wiederholte Messungen über den Zeitraum von ca. einem Jahr sollten unter Einbeziehung der klinischen Daten die Dynamik der Populationen an Vorläuferzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten sowie ihren Bezug zur Entwicklung der Tumorerkrankungen zeigen. Die parallele Bestimmung EpCAM-positiver Zellen, sollte Hinweise über einen möglichen Zusammenhang zur Population potentiell zirkulierender Tumorzellen geben. Beide Messungen wurden mit der scan[^]R High-Content Screening Station for Life Science an Tag 2 nach Blutabnahme durchgeführt. Dies gewährleistete zum einen einen von der Transportdauer unabhängigen, einheitlichen Messzeitpunkt für alle Proben. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass sich diese Wartezeit positiv auf die Detektion EpCAM-positiver Zellen auswirkt (persönliche Mitteilung Cornelia Jörke, Universitätsklinikum Jena), weshalb deren Bestimmung standardmäßig an Tag 2 nach Blutabnahme erfolgt. Ein daraus resultierender negativer Einfluss auf die CD90-Expression und die Vitalität der Zellen konnte nicht festgestellt werden. Das untersuchte Patientenkollektiv umfasste 72 Patientinnen mit gynäkologischen Tumoren. Für 46 von ihnen konnten im Verlauf mindestens drei Messungen generiert werden (siehe Tab. 33).

Tab. 33: Anzahl und Tumorentitäten der Patientinnen mit mindestens drei generierten Messzeitpunkten (Patienten-spezifische Informationen siehe Anhang A-1: Tab. 58, Tab. 59)

<i>Mamma-Ca.</i>	<i>Ovarial-Ca.</i>	<i>Zervix-Ca.</i>	<i>Chorion-Ca.</i>	<i>Pankreas-Ca.</i>
40	3	1	1	1

Von diesen wurden insgesamt 290 Blutproben aufgearbeitet, wobei in rund der Hälfte (51 %) auch CD90-positive Zellen nachweisbar waren. Deren absolute Anzahl lag dabei bei bis zu 54.000 pro ml. Weiterhin enthielten 14 der 23 untersuchten Normalblutproben CD90-positive Zellen. Bei diesen lag deren Anzahl, mit Ausnahme einer Probe, die 5133 CD90-positive Zellen enthielt und auch messtechnisch auffällig war, unter 1000/ml (siehe Abb. 37). Beides diente als Anhaltspunkt für die weitere Beurteilung der Proben.

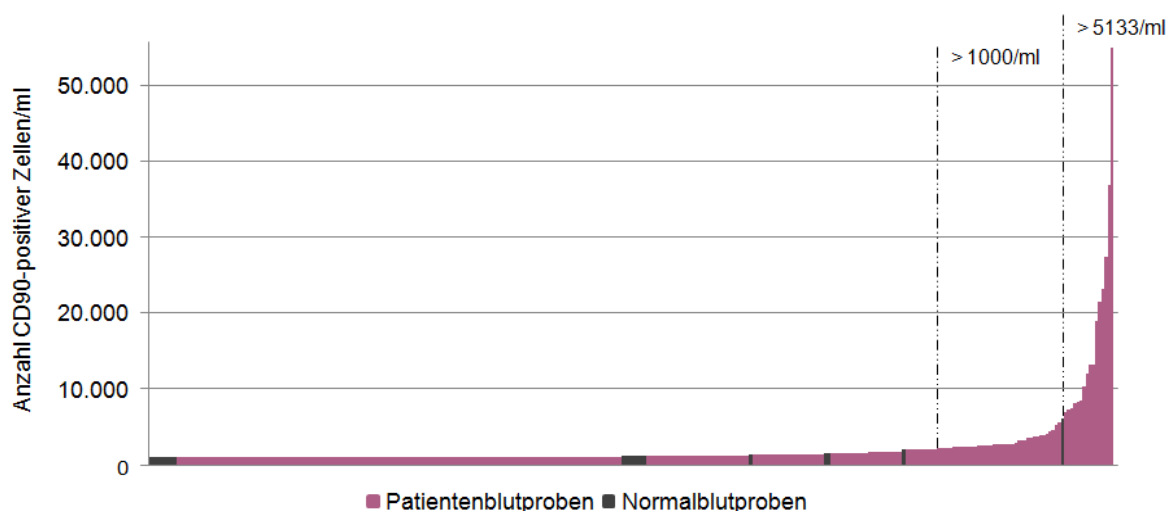


Abb. 37: Sortierung der Patienten- und Normalblutproben nach der Anzahl CD90-positiver Zellen
 Von den insgesamt 290 analysierten Patientenblutproben wiesen 148 CD90-positive Zellen auf, bei den 23 untersuchten Normalblutproben waren es 14. Während in den Patientenproben bis zu 54.000 CD90-positive Zellen pro ml detektiert werden konnten, waren es bei den Normalpersonen bis auf eine Ausnahme weniger als 1000/ml. Die eine, bereits messtechnisch auffällige Normalblutprobe enthielt 5133 CD90-positive Zellen pro ml. Beide Werte wurden für eine weitere Kategorisierung der Patientinnen herangezogen.

Im Fall der Tumorpatienten enthielten 20 % (58) der Proben mehr als 1000 CD90-positive Zellen/ml und waren 25, also rund einem Drittel, der untersuchten Patientinnen zuzuordnen. (siehe Abb. 38). Der Wert von 5133 CD90-positiven Zellen pro ml wurde in 16 Proben (5,5 %) überschritten, die von elf verschiedenen Patientinnen stammten. Für eine detaillierte Patientenaufschlüsselung siehe Tab. 63 und Tab. 64 (Anhang A-4).

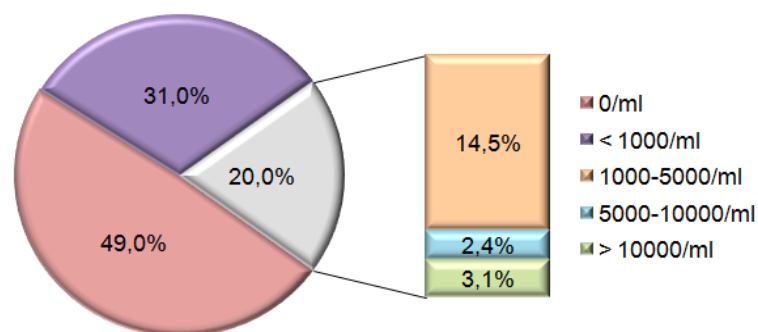


Abb. 38: Anteil der Patientenproben mit der entsprechenden Anzahl CD90-positiver Zellen
 In 49 % aller auf die Anzahl CD90-positiver Zellen hin untersuchten Patientenproben und 18 Patientinnen waren keine CD90-positiven Zellen nachweisbar. In 31 % aller Proben und 29 der untersuchten Patientinnen lag die Anzahl der detektierten CD90-positiven Zellen unter 1000/ml. Im Fall der restlichen 25 Patientinnen konnten zumindest zu einem der Messzeitpunkte mehr als 1000 CD90-positive Zellen pro ml nachgewiesen werden. Insgesamt entsprach die Anzahl dieser Proben einem Anteil von 20 % an allen untersuchten Proben. Dabei lag die absolute Anzahl CD90-positiver Zellen/ml in 14,5 % der Proben (14 Patientinnen) unter 5000, in 2,4 % der Fälle (3 Patientinnen) zwischen 5000 und 10.000 und bei 3,1 % (8 Patientinnen) über 10.000.

Die 46 Patientinnen, für die mindestens drei Messungen generiert werden konnten, wurden in Anlehnung an die für die Normalblutproben erhaltenen Werte drei verschiedenen Kategorien zugeordnet. Ausschlaggebend war dabei die Anzahl an Proben, in denen

mindestens 1000 CD90-positiven Zellen pro ml vorlagen und die maximal detektierte Anzahl CD90-positiver Zellen (siehe Tab. 34).

Tab. 34: Kategorien zur Einordnung der Patientinnen aus den CD90-Verlaufsuntersuchungen

Kategorie	Häufigkeit des Auftretens und Anzahl CD90-positiver Zellen in der Peripherie (Verlauf)
0	in < 50 % aller Proben > 1000/ml, Maximum \leq 5133/ml
1	in \geq 50 % aller Proben > 1000/ml, Maximum \leq 5133/ml
2	in \geq 50 % aller Proben > 1000/ml und/oder Maximum > 5133/ml

Von den 46 Patientinnen wurden 32 der Kategorie 0, fünf der Kategorie 1 und neun der Kategorie 2 zugewiesen (siehe Abb. 39). Bei den 14 Fällen in den Kategorien 1 und 2 handelte es sich bis auf eine Ausnahme um Mammakarzinome.

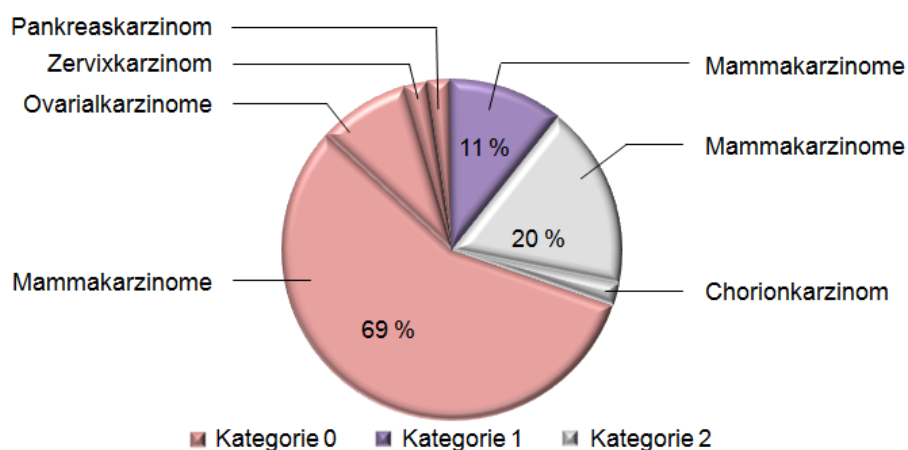


Abb. 39: Verteilung der Patientinnen aus den CD90-Verlaufsuntersuchungen auf die einzelnen Kategorien
In die Kategorie 0 wurden mit 26 Mammakarzinompatientinnen, vier Ovarialkarzinompatientinnen und je einer Patientin mit Zervix- bzw. Pankreaskarzinom insgesamt 69 % aller Patientinnen eingruppiert. Der Kategorie 1 waren mit fünf Mammakarzinompatientinnen 11 % aller Patientinnen zuzuordnen. Weitere acht Patientinnen mit einem Mammakarzinom und eine Chorionkarzinompatientin bildeten das verbleibende Fünftel aller Patientinnen in Kategorie 3.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass das Auftreten zirkulierender Zellen, die das epitheliale Zelladhäsions/-aktivierungs Molekül (EpCAM) auf der Oberfläche exprimieren für solide Tumoren wie das Mammakarzinom von prognostischer Bedeutung ist, wurde weiterhin untersucht, ob sich deren Verlauf zu dem der CD90-positiven Zellen in Beziehung setzen lässt. Dabei ergaben sich elf Fälle (23,91 %), in denen die Zellzahlen beider Populationen einem ähnlichen Muster zu folgen schienen (siehe Abb. 40).

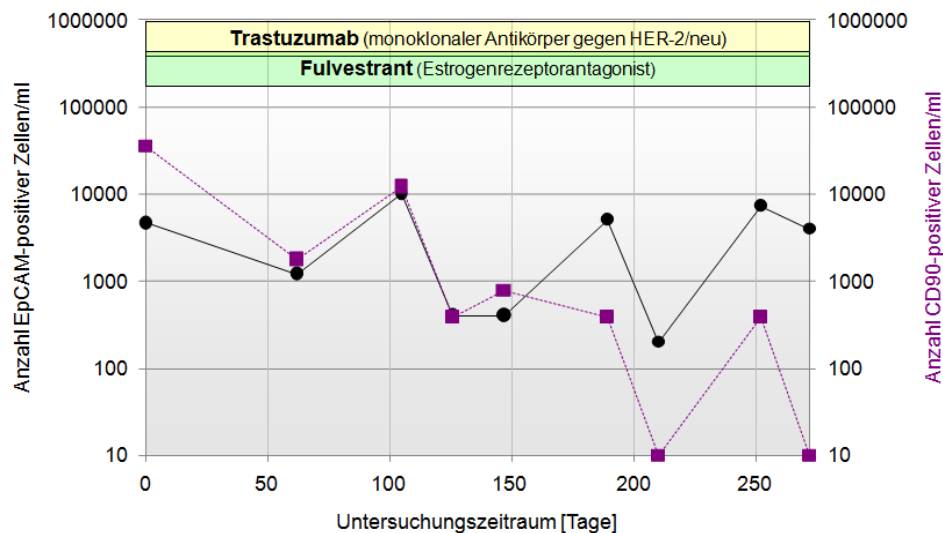


Abb. 40: CD90- und EpCAM-Verlaufsmuster (Patientin #4)

Erfassung der Zellzahlen CD90- und EpCAM-positiver Zellen bei einer Patientin mit einem 1999 diagnostizierten und 2001 metastasierten intraduktalem Mammakarzinom über einen Zeitraum von ca. neun Monaten. Im Rahmen der neun erfassten Messungen zeigte sich ein mehr oder weniger kontinuierlicher Abfall der Anzahl an CD90-positiven Zellen mit einem über weite Strecken ähnlichen Verlauf der Population an potentiell zirkulierenden Tumorzellen, welche anhand der Anzahl der Zellen gemessen wurde, die das epitheliale Zelladhäsions/-aktivierungs Molekül (EpCAM) auf der Oberfläche exprimieren.

HER-2/neu (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2)

In der Mehrheit der untersuchten Patientinnen änderten sich die Anzahlen EpCAM- und CD90-positiver Zellen jedoch unabhängig voneinander, wobei die Anzahl EpCAM-positiver Zellen im untersuchten Material von 32 der 46 Patientinnen (69,57 %) stets größer war als die der CD90-positiven Zellen. Bei nur einer Patientin (2,17 %) lag die Anzahl der CD90-positiven Zellen zu jedem Messzeitpunkt oberhalb der Anzahl der EpCAM-positiven Zellen. In allen anderen Fällen (13; 28,26 %) stieg zwischen bestimmten Messzeitpunkten die Anzahl der einen Zellpopulation an, während die der anderen abfiel. Obwohl bereits die zum Teil stark differierenden Zellzahlen dafür sprachen, dass es sich bei diesen Zellen um zwei verschiedene Populationen handelt, konnte dies auch mittels Fluoreszenz-basierter Doppelfärbung gezeigt werden.

Weiterhin sollte eine Analyse der CD90-Positivität und des Stromagehalts von Primärtumormaterial weitere Informationen bezüglich Herkunft und quantitativem Vorkommen der zirkulierenden CD90-positiven Zellen liefern. Hierzu wurde Paraffinmaterial von neun verschiedenen Patientinnen mit unterschiedlichen Parametern bezüglich der Anwesenheit von CD90-positiven Zellen in der Peripherie mittels Immunhistochemie untersucht. Dabei fiel auf, dass der Anteil des Stromas an der Tumormasse bei den meisten Mammakarzinom-Präparaten als eher gering einzuschätzen war. Die Metastase des Ovarialkarzinoms in der Milz hingegen zeigte ausgeprägte

Stromakomponenten. Der Nachweis von CD90 konnte dabei wie erwartet im fibroblastärem Stroma, aber auch im Bereich von Entzündungsreaktionen, am Übergang zum Fettgewebe sowie rund um Gefäße erbracht werden (siehe Abb. 41).

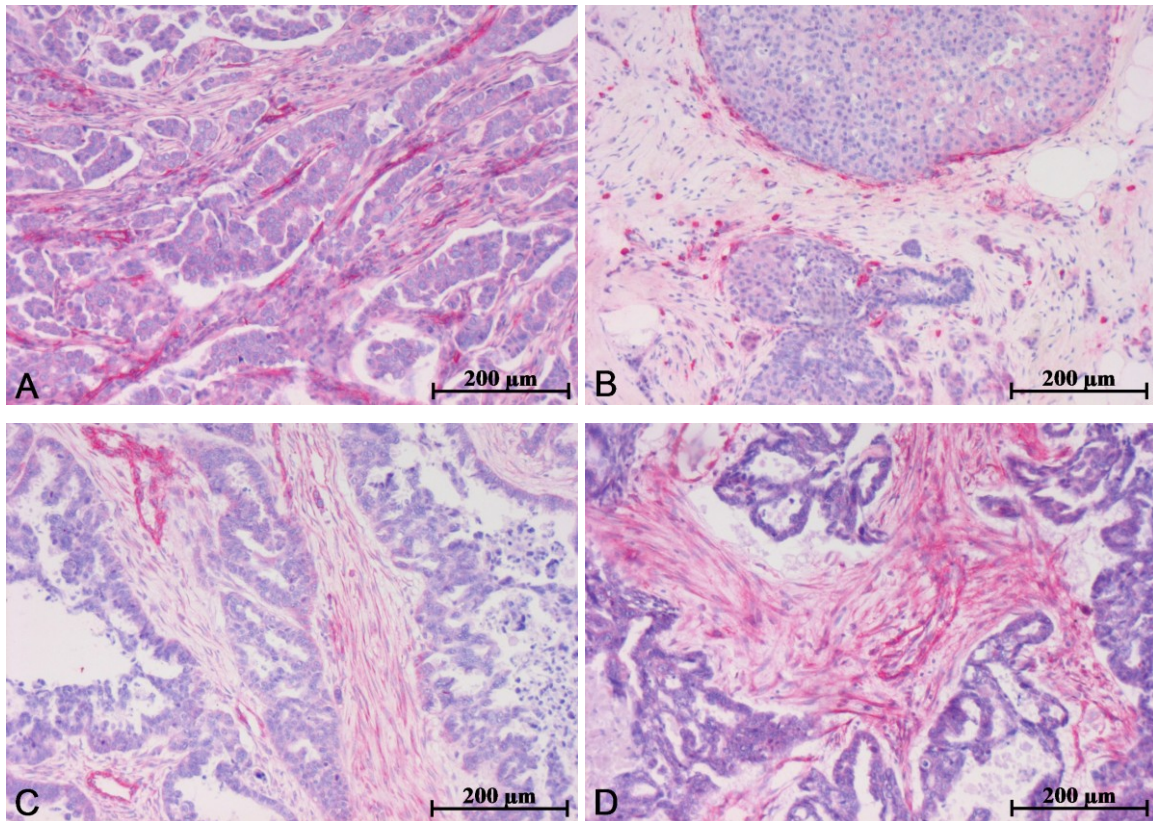


Abb. 41: Immunhistochemische Analysen nach CD90 an Paraffin-Gewebeschnitten

Die 4-6 µm dicken Paraffinschnitte wurden mit der Streptavidin-Biotin Komplex (ABC)-Methode und einem biotinylierten CD90-Antikörper gefärbt. (A) Invasiv mikropapilläres Mammakarzinom mit CD90-positiven Zellen im fibroblastärem Stroma zwischen den Tumorarealen. (B) Invasiv duktales und lobuläres Mammakarzinom mit ausgeprägtem Fibroblastensaum entlang der Ductuli. (C) Omentum einer Patientin mit einem serösen Zystadenokarzinom des Ovars mit CD90-positiven Zellen in Stromabereichen und rund um Gefäßstrukturen. (D) Milzmetastase eines serösen Zystadenokarzinom des Ovars mit großen Bereichen CD90-positiven Stromas.

Die Intensität der CD90-Färbung variierte dabei nicht nur zwischen den Präparaten verschiedener Patientinnen, sondern auch innerhalb verschiedener Tumor-Stroma-Areale eines Tumors. Bei einigen Präparaten war außerdem eine schwache CD90-Positivität der Tumorzellen festzustellen.

Für die Beurteilung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der CD90-Positivität des Primärtumors und der Anzahl CD90-positiver Zellen in der Zirkulation wurden auch die Tumorgewebe-Präparate anhand einer Skala von null bis zwei beurteilt (siehe Tab. 35).

Tab. 35: Maßstab zur Beurteilung der CD90-Positivität im Gewebe

Kategorie	CD90-Positivität im Gewebe (Übersichtsbeurteilung)
0	keine bis geringe CD90-Positivität
1	mittlere CD90-Positivität
2	hohe CD90-Positivität

Eine direkte Korrelation beider Parameter konnte, möglicherweise auch aufgrund der geringen Fallzahl, nicht nachgewiesen werden. Ebenso scheint es keine Rolle zu spielen, ob der Primärtumor zu Beginn des Untersuchungszeitraums bereits entfernt war oder nicht (siehe Abb. 42). Für eine detaillierte Patientenaufschlüsselung siehe Tab. 63 und Tab. 64 (Anhang).

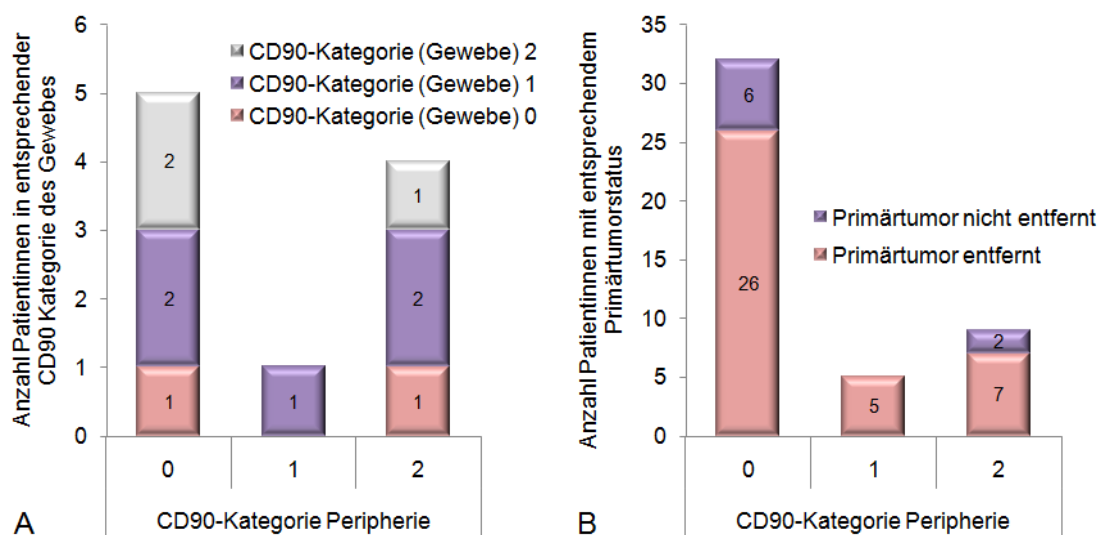


Abb. 42: Zusammenhang zwischen der Anzahl CD90-positiver Zellen in der Zirkulation und der CD90-Positivität des Gewebes (A) bzw. der Anwesenheit des Primärtumors zu Beginn des Messzeitraums (B). Eine hohe Anzahl CD90-positiver Zellen in der Peripherie ging dabei in einigen Fällen mit einem Stroma-armen Primärtumor einher, ebenso wie ein Teil der Stroma-reiche Tumoren mit einer niedrigen CD90-Kategorie in der Peripherie assoziiert waren (A). Weiterhin waren CD90-positive Zellen sowohl in Patientinnen unter neoadjuvanter Therapie als auch bei bereits entferntem Primärtumor nachweisbar (B).

Anschließend galt es zu untersuchen, ob hohe Anzahlen CD90-positiver Zellen mit dem Auftreten von Metastasierungsereignissen einhergehen, d.h., ob Patientinnen in den Kategorien 1 und 2 häufiger davon betroffen sind. Insgesamt wurde bei 14 der 46 Patientinnen eine Metastasierung verzeichnet. Bei elf von ihnen (acht Mammakarzinompatientinnen, eine Ovarialkarzinompatientin, eine Chorionkarzinompatientin und eine Pankreaskarzinompatientin) waren diese bereits vor dem Untersuchungszeitraum bekannt. Im Fall von fünf Mammakarzinompatientinnen wurden

während bzw. unmittelbar im Anschluss an die Verlaufsbeobachtung Metastasen diagnostiziert. Allgemein waren die von Metastasierungsereignissen betroffenen Patientinnen den Kategorien 0 und 2 zuzuordnen, wobei ihr Anteil an allen untersuchten Patientinnen in Kategorie 2 geringfügig höher war (Faktor 1,5) als in Kategorie 0 (siehe Abb. 43).

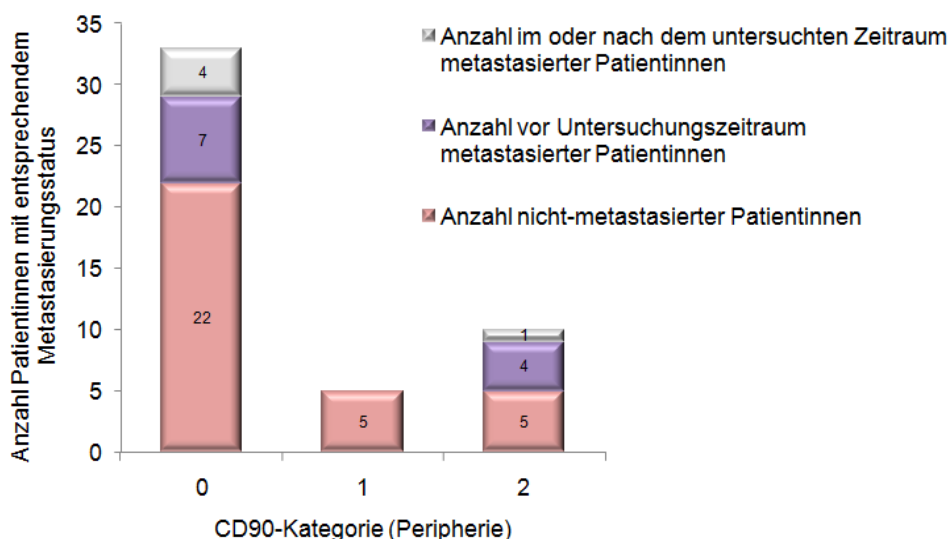


Abb. 43: Zusammenhang zwischen der Anzahl CD90-positiver Zellen in der Zirkulation und dem Metastasierungsstatus

Die 14 der 46 Patientinnen, bei denen im Rahmen ihrer Erkrankung Metastasen diagnostiziert wurden, ließen sich den Kategorien 0 und 2 zuordnen, wobei Patientinnen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten von Metastasierungsereignissen betroffen waren, mehrfach erfasst wurden. Der Anteil von Metastasierungsfällen lag dabei in der Kategorie 0 bei rund 33 %, in der Kategorie 1 bei 0 % und in der Kategorie 2 bei rund 50 %.

Betrachtet man nur die Kategorien 0 und 2 und fasst unabhängig vom zeitlichen Auftreten alle metastasierten Patientinnen zusammen, so zeigte sich hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens von Metastasierungsereignissen jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Außerdem in die Auswertung einbezogen wurden die Patienten- und Erkrankungs-spezifischen Parameter Alter, Grading-Stufe, Tumorgröße und Nodalstatus der 40 untersuchten Mammakarzinompatientinnen (nähere Informationen zur TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms sind im Anhang A-3 aufgeführt). Aufgrund der geringen Fallzahl im Rahmen der Primärtumoranalysen wurden hierfür nur die Ergebnisse der Verlaufsuntersuchungen herangezogen. Dabei zeigte sich zum einen, dass Patientinnen, die jünger als 40 Jahre waren überwiegend der CD90-Kategorie 0 zuzuordnen waren, während der Anteil der über 60-jährigen Patientinnen in Kategorie 2 am höchsten war (siehe Abb. 44).

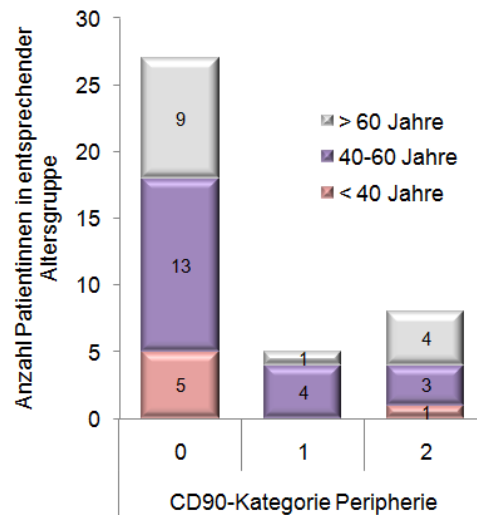


Abb. 44: Zusammenhang zwischen der Anzahl CD90-positiver Zellen in der Zirkulation und dem Alter der Patientinnen

Der Großteil der untersuchten Patientinnen jünger als 40 Jahre wies nur selten und/oder wenige CD90-positive Zellen im peripheren Blut auf. Der Anteil der über 60-jährigen hingegen war mit 50 % in Kategorie 2 am höchsten.

Weiterhin zeigte sich, dass rund ein Drittel der Patientinnen in Kategorie 0, aber knapp zwei Drittel der Patientinnen in der Kategorie 2 an HER-2/neu-positiven Primärtumoren erkrankt sind (siehe Abb. 45 A), welche u.a. mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert sind (Slamon et al., 1987). Zum anderen fiel auf, dass die Tumoren der Patientinnen der Kategorie 2 bis auf eine Ausnahme nur noch gering differenziert waren. In der Kategorie 0 waren dagegen mehr als 65 % der Tumoren noch mäßig differenziert, was mit einer besseren Prognose einhergeht (siehe Abb. 45 B).

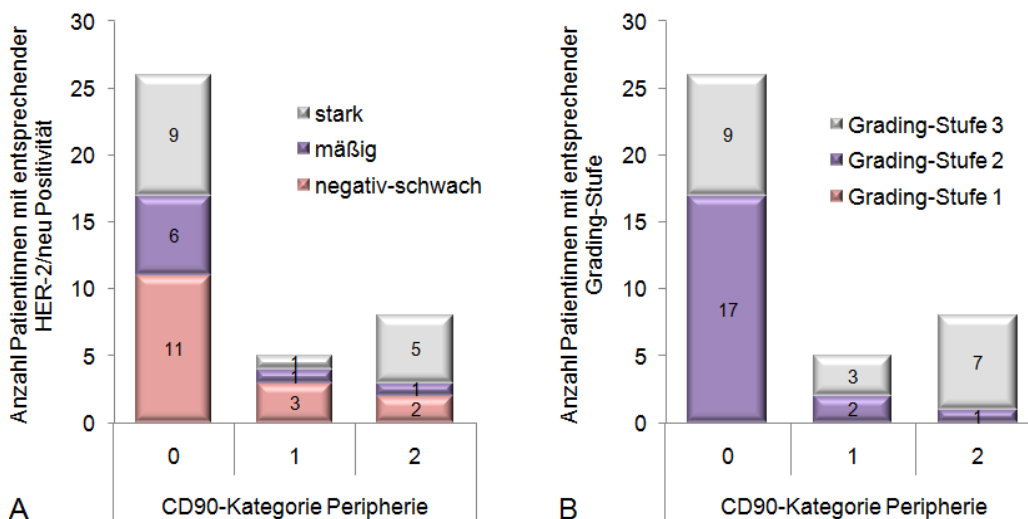


Abb. 45: Zusammenhang zwischen der Anzahl CD90-positiver Zellen in der Zirkulation und der HER-2/neu-Positivität (A) bzw. der Grading-Stufe des Primärtumors (B)

Der Anteil der Patientinnen mit HER-2/neu positiven bzw. gering differenzierten Tumoren (Gradingstufe 3) und damit einer ungünstigen Prognose ist in CD90-Kategorie 2 mit 62,5 % bzw. 87,5 % am höchsten.

Eine statistische Untersuchung des Zusammenhangs ergab im exakten Fisher Test (Chi-Quadrat-Test für geringe Fallzahlen) eine signifikante Korrelation zwischen einem mäßig (Grading-Stufe 2) bzw. gering (Gradingstufe 3) differenzierten Primärtumor und dem Vorkommen CD90-positiver Zellen in der Zirkulation (CD90-Kategorie 0 bzw. 2) (p-Wert zweiseitig = 0,0145). Kein Zusammenhang war indes zwischen dem Auftreten CD90-positiver Zellen in der Peripherie und der Tumorgröße bzw. dem Nodalstatus zu erkennen. Der Anteil kleinerer Tumoren (T1, T2) war mit rund 60 % in allen CD90-Kategorien ähnlich. Größere und das umliegende Gewebe infiltrierende Tumoren (T3, T4) waren mit drei Fällen unterrepräsentiert und alle der Kategorie 0 zuzuordnen (siehe Abb. 46 A). Ein recht ähnliches Bild zeigte sich auch bei der Betrachtung des Nodalstatus, d.h. der Ausprägung des regionären Lymphknotenbefalls. Während Patientinnen ohne oder mit geringem Lymphknotenbefall (N0, N1) in allen Kategorien zu finden waren, waren Patientinnen mit ausgedehnterem Lymphknotenbefall (N2, N3) alle der Kategorie 0 zugehörig (siehe Abb. 46 B).

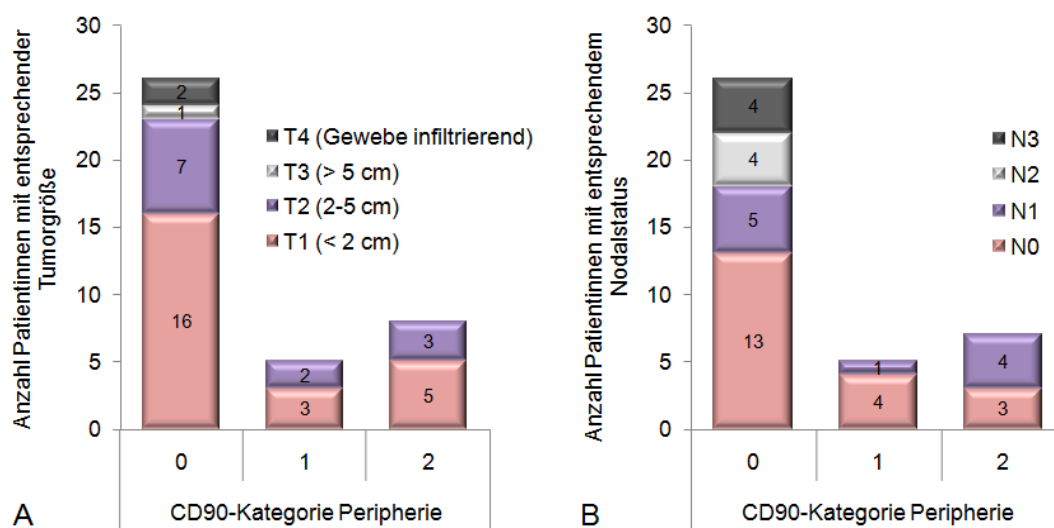


Abb. 46: Zusammenhang zwischen der Anzahl CD90-positiver Zellen in der Zirkulation und der Tumorgröße (A) bzw. dem Nodalstatus (B)

Während Patientinnen mit kleineren Tumoren (T1, T2) und Patientinnen ohne bzw. mit geringem Lymphknotenbefall (N0, N1) in allen Kategorien repräsentiert waren, waren Patientinnen mit größeren Tumoren (T3, T4) bzw. ausgedehnterem Lymphknotenbefall (N2, N3) ausschließlich in CD90-Kategorie 0 zu finden.

Ein die Beurteilung all dieser Zusammenhänge erschwerender Aspekt ist der Einfluss von Chemotherapeutika auf die verschiedenen Zelltypen. Zum einen wird angenommen, dass Elemente des Tumorstromas aufgrund ihrer höheren genetischen Stabilität selbst weniger anfällig für die Entwicklung von Therapieresistenzen sind als die Tumorzellen, dafür aber

wesentlich zur Vermittlung dieser beitragen (Übersicht: Udagawa und Wood, 2010). Zum anderen können chemotherapeutisch wirksame Substanzen zu einer Freisetzung von Zellen aus dem Knochenmark führen (Henniker, 2001). Für eine Betrachtung der Patientinnen hinsichtlich dieser Thematik wurden nur die Patientinnen herangezogen, bei denen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten ein ausreichender zeitlicher Abstand lag oder ein Therapiewechsel erfolgte bzw. die Therapie abgeschlossen wurde. Bei vier der unter diesen Kriterien verbleibenden zehn Fällen fiel die Anzahl CD90-positiver Zellen unter der Chemotherapie (Mono- oder Kombinationstherapie mit Docetaxel bzw. Kombination von Trastuzumab und Tamoxifen) ab. Bei einer Patientin kam es unter Behandlung mit Docetaxel zu einem Anstieg der Anzahl an CD90-positiven Zellen. Bei der anderen Hälfte der Patientinnen führte ein Therapiewechsel zu einer tendenziellen Änderung im Verhalten der Population CD90-positiver Zellen bzw. in zwei Fällen das Therapieende zu deren erneuter Zunahme (siehe Abb. 47).

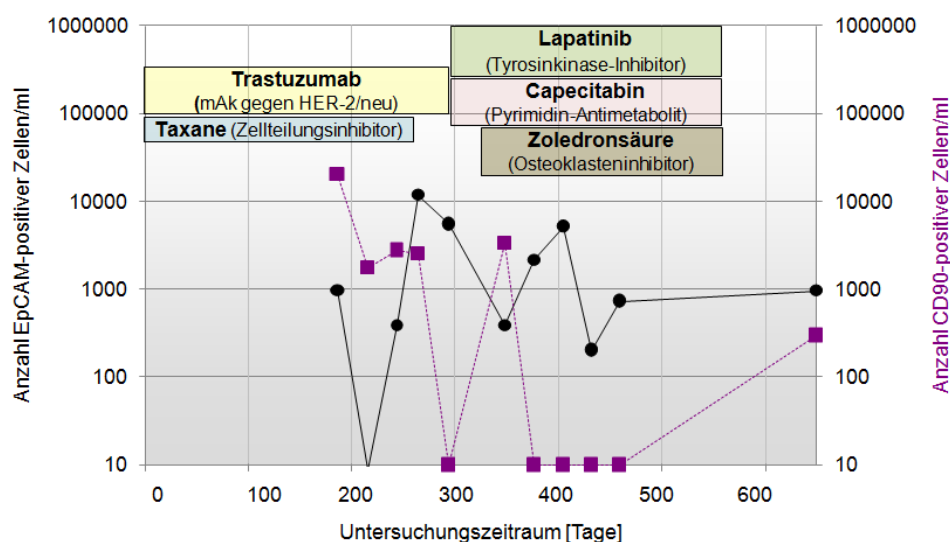


Abb. 47: CD90- und EpCAM-Verlaufsuntersuchung (Patientin #5)

Erfassung der Zellzahlen CD90- und EpCAM-positiver Zellen bei einer Patientin mit einem 2004 diagnostizierten und 2007 metastasierten invasiv duktalem Mammakarzinom über einen Zeitraum von ca. 15 Monaten. Im Rahmen der elf erfassten Messungen zeigten sich ein stabiler Rückgang der Anzahl an CD90-positiven Zellen nach einem Therapiewechsel sowie ein erneuter Anstieg nach Therapieende.

mAk (monoklonaler Antikörper); HER-2/neu (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2)

Aufgrund der zum Teil Gefäß-assoziierten Lokalisation der immunhistochemischen Färbung nach CD90 galt es abschließend zu klären, ob es sich bei den in der Zirkulation detektierten CD90-positiven Zellen möglicherweise um Gefäß- oder Gefäßvorläuferzellen handelt. Dazu wurden Fluoreszenz-basierte Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Koexpression von CD90 und dem Gefäßendothelzellmarker CD31 an peripherem Blut und

Knochenmarkpunktionsmaterial durchgeführt. Bei CD31 (PECAM1) handelt es sich um ein Oberflächenglykoprotein, welches hauptsächlich auf Endothelzellen von Gefäßen exprimiert wird, aber auch auf Blutplättchen, Monozyten, Neutrophilen und einigen T-Zell-Subtypen diffus verteilt ist. Bei den Fluoreszenz-basierten Untersuchungen an peripherem Blut von Mammakarzinompatientinnen zeigte sich in der Durchflusszytometrie eine überraschend große Population an CD31-positiven Zellen, die aber fast gänzlich CD90-negativ waren. Zur Analyse, ob es sich bei den vereinzelt detektierten Ereignissen im Bereich einer Doppelpositivität wirklich um CD31- und CD90-positive Zellen handelt, wurden die Proben zusätzlich auch mikroskopisch beurteilt (scan[^]R-System). Dabei konnte zwar die CD31-Positivität eines Teils der Zellen bestätigt werden, jedoch konnten keine CD90-positive Zellen detektiert werden, die eine CD31-Expression aufwiesen (siehe Abb. 48).



Abb. 48: Messfeldausschnitt einer scan[^]R-Analyse bezüglich der Koexpression von CD90 und CD31
 * vitale CD90-positive Zelle (Alexa Fluor 488-grün); ** vitale CD31-positive Zelle (APC-rot);
 *** apoptotische Zellen mit unspezifischer Grünfluoreszenz (7-Aminoactinomycin D-roter Zellkern).

Ein weiteres mögliches Reservoir für verschiedene Vorläuferzellen stellt das Knochenmark dar. Da die Knochenmarkpunktion im Falle gynäkologischer Tumorerkrankungen aber keine Standardintervention darstellt, wurde zur Analyse des blutbildenden Organs auf Patienten mit hämatologischen Malignitäten zurückgegriffen. Dabei zeigte sich bei den durchflusszytometrischen Analysen eine große CD31-positive Population mit einem stark variierenden Anteil CD90-positiver Zellen. Dieser stand in direkter Verbindung zum Gehalt an CD34-positiven Zellen, was in diesem Zusammenhang für deren hämatopoetischen Charakter spricht (siehe Abb. 49). Sowohl die detektierte CD90/CD31- als auch die CD90/CD34-Positivität konnten mikroskopisch bestätigt werden (siehe Abb. 50).

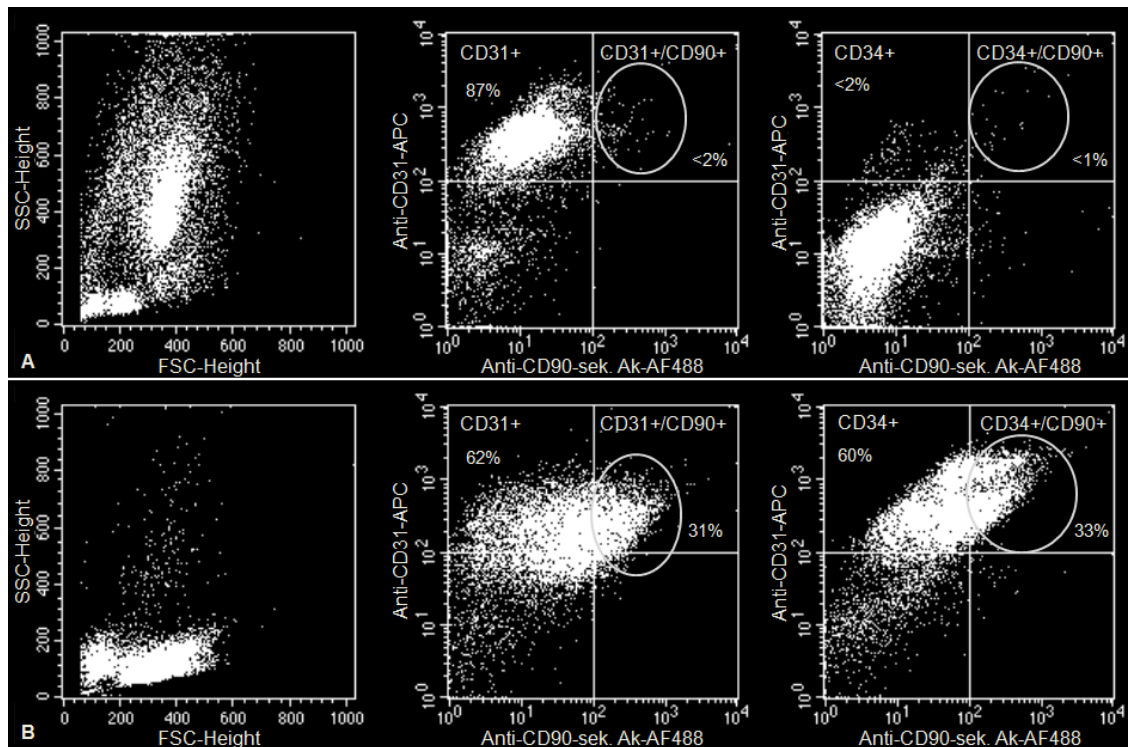


Abb. 49: FACS-Analysen bezüglich der Koexpression von CD90 und CD31 bzw. CD90 und CD34 an Knochenmarkaspirat von Patienten mit hämatologischen Malignitäten
(A) Knochenmarkaspirat einer Patientin mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) und einem Anteil von CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen unter 2 %. CD90-positive Zellen waren hier nicht sicher nachweisbar. (B) Knochenmarkaspirat eines Patienten mit Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) mit rund 60 % CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen. In diesem Fall ist sowohl eine CD90/CD31-positive als auch eine CD90/CD34-positive Zellpopulation nachweisbar.

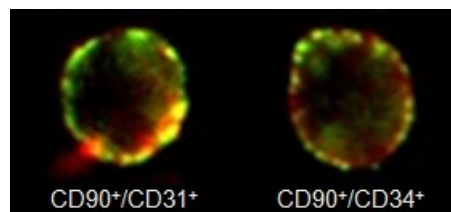


Abb. 50: scan[^]R-Aufnahme einer CD90/CD31 bzw. einer CD90/CD34-koexprimierenden Zelle
Der Nachweis erfolgte an Knochenmarkaspirat eines Patienten mit Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL).

Parallel durchgeführte Analysen an peripherem Blut des gleichen Patienten konnten ebenfalls Zellen dieser beiden doppelt-positiven Zellpopulationen nachweisen, wenn auch in deutlich geringerer Menge. Dies zeigt, dass der Nachweis zirkulierender potentieller Gefäß- und Gefäßvorläuferzellen prinzipiell möglich ist, dass die im Rahmen der CD90-Verlaufsbeobachtungen von Patientinnen mit gynäkologischen Tumoren detektierten Zellen jedoch nicht dazu gehören. Unterstützt wird dies außerdem durch die zusätzliche Analyse von Knochenmark bzw. peripherem Blut einer Patientin mit Ovarialkarzinom. Hier konnten kleine CD90⁺/CD31⁺- bzw. CD90⁺/CD34⁺-Zellpopulationen nachgewiesen werden, jedoch wiederum nur im Knochenmark, nicht aber in der Peripherie.

5 Diskussion

Es wird zunehmend deutlich, dass das stromale Mikroenvironment, in welchem sich die Tumorzellen entwickeln, viele Schritte der Tumorigenese grundlegend mitbestimmt. In verschiedenen experimentellen Tumormodellen konnte gezeigt werden, dass das Tumormikromilieu die Effizienz der Tumorentstehung, die Rate des Tumorwachstums, das Ausmaß der Invasivität und auch die Fähigkeit der Tumorzellen zu metastasieren beeinflusst (Übersicht: Elenbaas und Weinberg, 2001). Die meisten Informationen über die Rolle dieser Stroma-Epithel-Interaktion entstammen Studien über den Beitrag zu den frühen Schritten der Tumorigenese, die zur Bildung des Primärtumors führen. So wurde die Karzinogenese-fördernde Fähigkeit von Tumorstroma-Fibroblasten mit Tumor-Xenograft-Modellen untersucht, in denen Tumorzellen zusammen mit Tumor-assoziierten Fibroblasten (TAFs), nicht-kanzerogenen Fibroblasten aus der Tumorumgebung oder Fibroblasten von gesunden Spendern in immundefiziente Mäuse implantiert wurden. Die Tumoren, die sich aus der Kombination Tumorzellen und TAFs entwickelten zeigten dabei im Vergleich zu den anderen ein schnelleres Wachstum (Übersicht: Shimoda et al., 2010). Ähnliche Mechanismen scheinen aber auch zur Entstehung metastatischer Läsionen beizutragen. Dabei deutet das zum Teil zahlreiche Vorkommen von Stromazellen in Metastasen darauf hin, dass auch die vermutlich autonomen metastatischen Zellen, für ein optimales Wachstum in ihrer neuen Umgebung, weiterhin der Unterstützung durch Stromazellen bedürfen (Übersicht: Elenbaas und Weinberg, 2001). Neben der Extrazellulärmatrix, Perizyten und endothelialen Zellen übernehmen vor allem die bereits erwähnten TAFs einen entscheidenden Part in diesem Kontext. Allerdings wird über die Herkunft dieser Zellen, sowohl am Ort des Primärtumors als auch im Rahmen von Metastasierungsereignissen, noch immer kontrovers diskutiert. Neben Transdifferenzierungs- und Selektionsprozessen ortsständiger Fibroblasten scheinen auch über die Peripherie rekrutierte Zellen zu dieser Zellpopulation beizutragen (Shimoda et al., 2010). Dabei ist sowohl ein Auftreten von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark als auch das Vorkommen zirkulierender, vom Primärtumor freigesetzter TAFs im stromalen Bett für die Entstehung von Metastasen denkbar. Zur näheren Untersuchung dieses Sachverhaltes sollte im Rahmen dieser Arbeit geprüft werden, ob sich TAFs aus dem peripheren Blut von Krebspatienten isolieren lassen, da dies als Voraussetzung für die Hypothese der Rekrutierung Tumor-assoziiierter Fibroblasten zum Metastasierungsort über die Peripherie

anzusehen ist. Da es sich bei diesen Zellen jedoch um eine sehr seltene Zellpopulation handeln dürfte, bedarf deren nähere Charakterisierung zunächst einer effektiven Anreicherung. Die Tatsache, dass Zellen von biomedizinischem Interesse trotz ihrer funktionellen Bedeutsamkeit oft nur in sehr geringer Zahl präsent sind, führte in den letzten Jahren zur Etablierung diverser Analyse- und Separationsverfahren (Übersicht: Pappas und Wang, 2007). Heute stellt die Anreicherung von seltenen Zellen aus heterogenen Zellpools ein wichtiges Werkzeug im Bereich wissenschaftlicher Forschung und Medizin dar und wird ständig weiter entwickelt. Die dabei zur Verfügung stehenden Methoden nutzen in erster Linie die unterschiedlichen physikochemischen und immunologischen Eigenschaften verschiedener Zelltypen. Neben Zellgröße, -dichte und -ladung basieren viele der Verfahren, wie Durchflusszytometrie und Magnetseparation, auf der Affinität zwischen Antikörpern und Zellantigenen. In erster Linie beeinflussen die unterschiedlichen Eigenschaften der zu separierenden Zellen und die weiterführenden Analysetechniken die Wahl des zur Anwendung kommenden Prinzips. Aber auch die Erfüllung der wesentlichen Anforderungen, die sich an ein effizientes Anreicherungsverfahren stellen, wie hoher Durchsatz (Effektivität), hohe Ausbeute (Sensitivität) und hohe Reinheit (Spezifität) unter physiologischen Bedingungen (Erhaltung der Zell-Vitalität), stellt ein entscheidendes Kriterium dar. Auf der Grundlage der bereits vor Jahren in unserem Labor gewonnenen Erkenntnis, dass Tumorzellen Carboxymethyldextran-umhüllte Nanopartikel in einem bestimmten Zeitfenster in deutlich höherem Maße aufnehmen als Leukozyten (Clement et al., 2006), wurde zunächst untersucht, ob sich mit dieser Methode auch Tumor-assoziierte Stromazellen anreichern lassen. Aufgrund der hohen Zellverluste, der geringen Ausbeute und der eingeschränkten Vitalität der auf diese Weise erhaltenen Zielzellen erwies sich dieser Ansatz jedoch als ungeeignet.

In einem nächsten Schritt wurde deshalb nach einem, möglichst viele Fibroblastensubtypen abdeckendem Marker gesucht, um ein Zell-spezifischeres, immunomagnetisches und Säulen-unabhängiges Separationsverfahren zu testen. Für bestimmte Fibroblasten-Phänotypen sind bereits gut etablierte Indikatoren beschrieben, jedoch wird keiner von ihnen ausschließlich von Fibroblasten und dann gleichzeitig in allen Subtypen exprimiert. Bei dem am häufigsten zur Identifizierung von Myofibroblasten eingesetzten Marker handelt es sich um das alpha-glatte Muskelaktin (α -SMA). Hawsawi und Kollegen zeigten in einer Untersuchung am Mammakarzinom, dass Tumor-assoziierte Fibroblasten und

Fibroblasten aus angrenzenden Tumor-freien Arealen α -SMA exprimieren, wobei der Anteil positiver Zellen zwischen 5 % und 100 % bzw. 5 % und 90 % lag. Nahezu undetektierbar war es hingegen in fibroblastären Zellen aus Gewebe von Mammareduktionsplastiken (Hawsawi et al., 2008). Eine Expression des ebenfalls untersuchten Moleküls CD90 (Thy-1) war hingegen in allen drei Fibroblastentypen nachweisbar, was vermuten lässt, dass es keine direkte Verbindung zwischen der Expression von CD90 und der Transformation in Myofibroblasten während der Mammakarzinogenese gibt (Hawsawi et al., 2008). Eine andere Untersuchung von Koumas und Kollegen zeigte andererseits, dass nur CD90-positive Fibroblasten eine durch die Induktion der α -SMA-Expression bedingte Differenzierung zu Myofibroblasten durchlaufen, was für einen Zusammenhang zwischen der Expression beider Moleküle spricht (Koumas et al., 2003). Da die Selektion vitaler Zellen eine Fixierung und Permeabilisierung zum Nachweis intrazellulärer Marker jedoch ausschließt, fiel die Wahl schließlich auf CD90. Dieses, während der Entwicklung regulierte, evolutionär konservierte Zelloberflächen-Glykoprotein wird von verschiedenen Zelltypen wie Thymozyten, Fibroblasten, neuronalen Zellen, hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen sowie einigen Krebszellen exprimiert (Übersicht: Barker und Hagood, 2009). Aus dieser Vielfalt ergibt sich ein, trotz zahlreicher Untersuchungen, noch immer nicht vollständig verstandenes Spektrum biologischer Funktionen. Gezeigt werden konnte diesbezüglich eine Beteiligung an biologischen Prozessen im Rahmen der Regulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, wie Zelladhäsion, Tumorwachstum, Migration und Apoptose (Übersicht: Rege und Hagood, 2006). Zusammenfassend machen das sowohl Fibroblasten als auch Stammzellen umfassende Zellspektrum sowie die Übernahme verschiedenster, mit der Tumorigenese assoziierter Funktionen, CD90 zu einem geeigneten Molekül zur Klärung der Rolle und Herkunft Tumor-assoziiierter Fibroblasten während der Metastasierung. So könnte das Migrationsvermögen, welches Voraussetzung für den Austritt aus dem Zellverband und den Eintritt in die Zirkulation ist, durch Stammzell-assoziierte Eigenschaften vermittelt werden. Mittels Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie konnte zunächst im Zellkultursystem ein spezifischer CD90-Nachweis an verschiedenen Fibroblasten geführt werden. Dabei zeigte sich eine überwiegend membranständige, stellenweise geclusterte Antigenverteilung unterschiedlicher Intensität und Ausdehnung. Für CD90 ist in diesem Zusammenhang bereits die durch das Fehlen der Transmembrandomäne bedingte hohe Membranmobilität

von einem Teil (40-60%) der CD90-Moleküle beschrieben. Der in Mäusen gemessene Membrandiffusionskoeffizient ist dabei bis zu zehnmal größer als der anderer membrandurchspannender Proteine (Übersicht: Haeryfar und Hoskin, 2004). Die variierende CD90-Expressionsstärke dürfte Ausdruck eines differentiellen Zellaktivierungsgrades sein. So konnten Franco und Kollegen zeigen, dass TAFs des Prostatakarzinoms eine ebenfalls sehr heterogene und zum Teil recht intensive CD90-Expression aufweisen, wohingegen in gesunden Fibroblasten der Prostata lediglich eine schwache und außerdem homogene Verteilung detektierbar war (Franco et al., 2010).

In einem nächsten Schritt wurde dann versucht, mit dem RoboSep[®] Zellseparationssystem CD90-positive Zellen aus gepoolten Blutproben von Patienten verschiedener gynäkologischer und urologischer Tumorerkrankungen anzureichern, um diese im Anschluss näher zu charakterisieren. Dabei fiel zum einen auf, dass die Zielzellen aus Material von Mammakarzinompatientinnen häufiger und in höherer Anzahl isolierbar waren als aus Patienten und Patientinnen anderer Tumorentitäten. Zum anderen zeigte sich aber auch innerhalb des Mammakarzinom Patientenkollektivs eine hohe Varianz bezüglich der Ausbeute CD90-positiver Zellen. Die angereicherten Zellen wiesen dabei die für CD90 typische Antigenverteilung auf, die aufgrund ihrer Ungleichmäßigkeit und der verschiedenen starken Ausprägung auch Einfluss auf das Separationsergebnis haben dürfte. Desmouliere und Kollegen beschreiben den Tumor-assoziierten Fibroblasten mit einem Anteil von bis zu 70 % an der gesamten Tumormasse als den prominentesten Zelltypen innerhalb des Tumorstromas vieler Tumoren, insbesondere aber des Mamma- und des Pankreaskarzinoms (Desmouliere et al., 2004). Untersuchungen im Tiermodell bezüglich der Ausprägung des durch verschiedene Pankreas-, Brust-, Kolon- und hämatologischen Tumorzelllinien induzierten Stromas bestätigten dies insofern, da eine der Mammakarzinomzelllinien die umfangreichste stromale Reaktion induzierte, wohingegen die andere eine deutlich geringere und die untersuchten hämatologischen Zelllinien keine oder nur eine sehr schwache Stromareaktion zeigten (Sangai et al., 2005). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass neben der Tumorentität auch individuelle Tumor- und Patientenspezifische Parameter einen entscheidenden Einfluss auf Stromaanteil und -komposition haben. Nachdem also aus gepoolten Patientenblutproben prinzipiell CD90-positive Zellen isoliert werden konnten, galt es deren Charakter näher zu definieren. Eine Oberflächenexpression von CD90 ist außer für die in diesem Kontext interessanten Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen auch für eine Subpopulation CD34-

positiver hämatopoetischer Stammzellen beschrieben (Übersicht: Haeryfar und Hoskin, 2004; Dennis et al., 2007). Fluoreszenz-basierte Doppelfärbungen an separierten und unseparierten Proben hinsichtlich einer Koexpression von CD90 und CD34 konnten deren hämatopoetischen Charakter jedoch ausschließen. Anschließend sollten Ausbeute und Effizienz der Anreicherung vor allem durch die Auswahl von geeignetem Probenmaterial erhöht werden. Dafür wurden in erster Linie Blutproben zufällig gewählter Mammakarzinompatientinnen unsepariert auf die Anwesenheit CD90-positiver Zellen hin getestet. Ein Nachweis war so ab einer Anzahl von ca. 200 CD90-positiven Zellen pro ml peripherem Blut realisierbar. Dies ermöglichte zum einen die Separation und Analyse CD90-positiver Zellen einzelner ausgewählter Patientinnen und zum anderen deren wiederholte Quantifizierung im Zeitverlauf. Für die nähere Charakterisierung der angereicherten CD90-positiven Zellen wurden diese entweder für Proteinanalysen auf Objektträger aufgebracht oder nach einer Einzelzellpräparation auf Genexpressionsebene untersucht. Vor dem Hintergrund der vielfältig diskutierten Herkunft Tumor-assoziiierter Fibroblasten und der damit verbundenen Heterogenität einzelner Subpopulationen galt das Interesse dabei mehreren, sowohl Tumor- und Stroma- als auch Stammzell-assoziierten Markern. Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen konnte so die Expression der Oberflächenantigene CD29, CD44, CD105 sowie FAP und VEGFR-1 in unterschiedlicher Intensität und Häufigkeit in den einzelnen CD90-Positivfraktionen beobachtet werden, was wiederum für deren ausgeprägte Heterogenität spricht. Hervorzuheben sind hierbei vor allem CD44 und FAP- α . Bei dem Glykoprotein CD44 handelt es sich um einen Oberflächenrezeptor der Hyaluronsäure, welcher an der Zelladhäsion, Migration und Metastasierung von Tumorzellen beteiligt ist (Orian-Rousseau, 2010). CD44 wird u.a. als Marker für die Identifizierung putativer Tumorstammzellen im Mammakarzinom eingesetzt. Dabei scheint es eine Korrelation zwischen CD44-positiven Tumorzellen und einem herabgesetzten Patientenüberleben zu geben (Shipitsin, 2007). Eine Studie von Yang und Kollegen gab in diesem Zusammenhang zudem Hinweise auf die Bedeutung CD44-positiver Zellen bei der Metastasierung. So konnte eine CD90/CD44 doppelt positive Zellpopulation in Zelllinien des Hepatozellulären Karzinoms detektiert werden, die in einem Tumor-Metastasierungsmodell nach Injektion in immundefiziente Mäuse zur Entstehung von Tumorknötchen in Leber und Lunge führte. Die metastatischen Tumoren wiesen dabei einen signifikant höheren Anteil CD90-positiver und CD90/CD44 doppelt positiver Zellen auf als die primären Tumoren. Die Gabe eines

Anti-CD44-Antikörpers konnte die Bildung dieser lokalen und metastatischen Läsionen durch eine Apoptose-Induktion in den CD90-positiven Zellen verhindern. In einer parallel durchgeführten Untersuchung an peripherem Blut konnten CD90-positive Zellen in einem Großteil der Blutproben von Leberkarzinompatienten detektiert werden, die ebenfalls eine Koexpression von CD44 aufwiesen (Yang et al., 2008). Ein anderer vielversprechender Kandidat für einen Stroma-spezifischen Marker ist das Fibroblasten-Aktivierungs-Protein-alpha (FAP- α), eine Dipeptidylpeptidase der Serin Proteasen Familie (Übersicht: Beacham und Cukierman, 2005). FAP- α ist selektiv in reaktiven Stromafibroblasten von mehr als 90 % aller soliden Tumoren induziert. Die genaue biologische Funktion ist bisher noch schwer zu fassen, es scheint jedoch, als wirke FAP- α über die Degradation der Extrazellulärmatrix und/oder die Prozessierung löslicher Faktoren. Eine Überexpression des Moleküls ist assoziiert mit einem vermehrten Tumorwachstum, Invasion, Angiogenese und Metastasierung. Andere Studien zeigen jedoch auch einen positiven Effekt, z.B. auf das Gesamtüberleben von Mammakarzinompatientinnen. Wie auch immer, vor allem die differentielle Expression im Vergleich zu Normalgewebe macht es zu einem vielversprechenden therapeutischen Target (Übersicht: Hofmeister et al., 2008). Gegen das Oberflächen-exprimierte FAP- α gerichtete Antikörper stellten daher auch den ersten Kandidaten klinischer Medikamente dar, die selektiv gegen das Stromakompartiment gerichtet sind (Mersmann et al., 2001).

Im Rahmen der weiterhin durchgeführten Genexpressionsanalysen wurden einzelne CD90-positive Zellen aus der angereicherten Fraktion präpariert und zunächst in einer qualitativen One-Step-RT-PCR simultan auf die Expression verschiedener Tumor-, Stroma- und Stammzell-spezifischer Gene hin untersucht. Als Referenz wurde das für das 60S Ribosomale Protein L13A kodierende Gen RPL13A verwendet, welches für mesenchymale Stammzellen als geeigneter interner Standard für Genexpressionsanalysen beschrieben ist (Jesnowski, 2002; Curtis et al., 2010). Nur Zellen bzw. mRNA-Templates, in denen die Expression von RPL13A nachgewiesen werden konnte, wurden in die Auswertung einbezogen. Detektiert werden konnte so zunächst die Expression von CD90 in allen analysierten Fibroblastenproben und 70 % der aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten angereicherten CD90-positiven Zellen. Weiterhin wurde die Expression des epithelialen Zelladhäsions/-aktivierungs Moleküls EpCAM (HEA125, CD326) und des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (HER-2/neu, c-erbB-2) untersucht. EpCAM wird von einer großen Vielfalt humaner Adeno- und Plattenepithelkarzinome, aber

auch von einer Reihe normaler Epithelien exprimiert (Übersicht: Baeuerle und Gires, 2007). EpCAM-basierte Detektions- und Anreicherungsverfahren stellen außerdem die Grundlage vieler Ansätze zur Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen dar. Eine Genamplifikation oder Proteinüberexpression des Onkogens HER-2/neu ist für einen Teil invasiver Brusttumoren beschrieben und gilt dort als prognostisch relevant (Stern et al., 1986; Übersicht: Ross et al., 2003). Eine Expression von EpCAM war in nur 8 % der untersuchten CD90-positiven Zellen nachweisbar, was bestätigt, dass es sich bei der Population CD90-positiver Zellen nicht um zirkulierende epitheliale Tumorzellen handelt. Der kleine Anteil der EpCAM exprimierenden Zellen könnte aus der Übergangszone zwischen Tumor und Stroma stammen. Der Nachweis der mRNA-Expression von HER-2/neu war in 16 % aller analysierten CD90-positiven Zellen möglich. Jiang und Kollegen identifizierten in einer Untersuchung am Magenkarzinom, für welches ebenfalls eine prognostische Bedeutung des HER-2/neu Moleküls beschrieben ist (Tanner et al., 2005), eine CD90-positive Tumorstammzellpopulation. In einem entsprechenden Primärtumormodell ging eine Amplifikation und Überexpression von HER-2/neu mit der Expression von CD90 und einer hohen Tumorigenität in vivo einher (Jiang et al., 2011). Das ebenfalls untersuchte Gen Vimentin wird in Zellen mesenchymalen Ursprungs wie z.B. Fibroblasten exprimiert und dient u.a. als Marker für die Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT), die im Rahmen von Metastasierungsereignissen das Herauslösen der Tumorzellen aus dem Gewebeverband erleichtert (Dutsch-Wicherek, 2010). Wider Erwarten war eine Expression von Vimentin weder in den primären Vorhaut-Fibroblasten noch in den aus dem Blut angereicherten Zellen möglich. Eventuell könnte hier ein technisches Problem ursächlich sein. So wäre es möglich, dass die Reaktionsbedingungen und die Wechselwirkungen zwischen den zahlreichen Komponenten der Multiplex-PCR die Entstehung bestimmter PCR-Produkte unterdrücken. Die Wahl anderer Primerbindungsstellen könnte die Situation möglicherweise verbessern. Alternativ wäre der Einsatz anderer, in diesem Zusammenhang beschriebener Marker wie N-Cadherin denkbar. Es wurde weiterhin die Expression des bereits immunhistochemisch analysierten Moleküls FAP- α und des am häufigsten zur Identifizierung von Myofibroblasten herangezogene Markers α -SMA untersucht. Für beide wurde ein im Vergleich zum normalen Brustdrüsenstroma erhöhtes Expressionslevel im Tumor-assoziierten Stroma beschrieben (Übersicht: Arendt et al., 2010). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen in α -SMA-positive Zellen mit TAF-ähnlichen Eigenschaften

differenzieren (Spaeth et al., 2009; Mishra et al., 2008). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde die Expression beider Gene zunächst an 100 pg aus Zellkulturzellen isolierter RNA untersucht. Dabei konnte in mehr als 85 % der untersuchten Proben verschiedener Fibroblasten, nicht aber in Tumorzellen des Mammakarzinoms die Expression von α -SMA nachgewiesen werden. Eine Expression des Fibroblasten-Aktivierungs-Proteins-alpha war hingegen nur in mRNA-Proben der primären (71 %), nicht aber der immortalisierten Vorhaut-Fibroblasten detektierbar. Dies zeigt, dass sich auch gleiche Zelltypen gleicher Herkunft hinsichtlich der Expression bestimmter Aktivierungs-abhängiger Marker unterscheiden können und, dass sich CD90 für einen Aktivierungs-unabhängigen Fibroblastennachweis besser eignet. In den außerdem durchgeführten Analysen an isolierten Einzelzellen der immortalisierten Fibroblasten war α -SMA in allen und auch FAP- α in 60 % der Zellen nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass einzelne und Intensitäts-schwache Signale vor einem größeren Hintergrund nicht erkennbar sind und macht deutlich, wie wichtig Einzelzell-basierte Nachweismethoden bei der Untersuchung heterogener Zellpopulationen sind. Ein ganz ähnliches Ergebnis ergab sich auch für SDF-1. Dieser Ligand des Chemokinrezeptors CXCR4 wird überwiegend in Organen exprimiert, die als Hauptlokalisationen der Mammakarzinommetastasierung gelten, wie z.B. Lymphknoten, Lunge, Knochenmark und Leber. Der Chemokinrezeptor CXCR4 selbst wird in Brustkrebszellen, sowohl im Primärtumor als auch in Metastasen, stark exprimiert. Bezüglich der Bedeutung dieser Interaktion konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit neutralisierenden Antikörpern gegen CXCR4 zur Reduzierung der Metastasierung in Lymphknoten und Lunge führt (Kopfstein und Christofori, 2006). Ein Expressionsnachweis von α -SMA, FAP- α und SDF-1 war jedoch auch in einzeln aus dem peripheren Blut präparierten CD90-positiven Zellen nicht möglich. Ursächlich hierfür könnte eine Art Ruhezustand dieser Zellen sein, der es ihnen ermöglicht, auch unter chemotherapeutischen Interventionen in der Zirkulation zu überleben. Bestimmte, mitunter von den Tumorzellen getriggerte, Signale könnten die Zellen dann wiederum aktivieren und zu deren Absiedlung an potentiellen prä-metastatischen Nischen führen. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass es sich bei den zirkulierenden CD90-positiven Zellen eher um stromale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark handelt, die ihren fibroblastären Charakter und die damit assoziierte Markerexpression erst im Zielgewebe annehmen. Aus diesem Grund wurde mit SCF auch die Expression eines mit Stammzeleigenschaften assoziierten Gens untersucht. Bei dem Stammzellfaktor (KIT-Ligand) handelt es sich um

ein hämatopoetisches Zytokin, welches biologische Effekte wie die Proliferation, Differenzierung und Mobilisierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen vermittelt und von Fibroblasten und endothelialen Zellen konstitutiv produziert wird (Broudy, 1997). Von den untersuchten Zellkulturzellen wiesen, unabhängig von der Art des Templates, nur die primären Vorhaut-Fibroblasten (71 %) eine Expression von SCF auf. Bei den analysierten CD90-positiven Zellen waren es 81 %. Bei einem ebenfalls in hohem Maße (80 %) von diesen Zellen exprimiertem Gen handelt es sich um Gremlin-1, welches für einen Knochenmorphogenesefaktor-Antagonisten kodiert. Diese spielen eine wichtige Rolle in der Biologie von Stamm- und Vorläuferzellen, in dem sie die Balance zwischen Expansion und Differenzierung regulieren. Ähnliche Funktionen liegen daher auch im Tumorgeschehen nahe. Gremlin 1 wird z.B. von Stromazellen im Basalzellkarzinom der Haut konsistent höher exprimiert als in gesunder Haut. Dies konnte auch für mehrere andere Karzinome und das korrespondierende Normalgewebe gezeigt werden. Dabei wurde Gremlin von stromalen Zellen in mindestens 50 % der Proben von Blasen-, Mamma-, Lungen-, Kolon-, Pankreas- und Ösophaguskarzinompatienten exprimiert, die immunhistochemisch als Fibroblasten erkennbar waren. Basierend auf diesen Daten wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem Tumorzellen zur Aufrechterhaltung ihrer Expansion von Tumorfibroblasten sezernierte BMP-Antagonisten benötigen (Sneddon et al., 2006). Zusammenfassend war die Expression der für die nähere Untersuchung der CD90-positiven Zellen herangezogenen Tumor-, Stroma- und Stammzell-assoziierten Marker mittels qualitativer PCR zumindest in einem Teil der aus dem Blut angereicherten Zellen möglich. In einem direkten Vergleich mit CD90-negativen Zellen zeigte sich jedoch, dass die Expressionshäufigkeit dieser Gene in diesen Zellen ähnlich war oder sogar über der der CD90-positiven Zellen lag. Dies lässt vermuten, dass die Expression dieser Gene auch in anderen Zellen des peripheren Blutes zumindest eine geringe Rolle spielt. Außerdem können bei der Detektion einer einzelnen Zielzelle in einer Masse von anderen Zellen auch wenige Transkripte ein falsch-positives Ergebnis hervorrufen.

Aufgrund des allgemeinen Fehlens ausschließlich Tumor-spezifischer Marker gewann die quantitative PCR zunehmend an Bedeutung, da sie es erlaubt, Grenzen in der Transkriptmenge von Nicht-Tumor-Proben zu setzen, oberhalb derer Transkripte als Tumor-assoziiert gelten (Übersicht: Pantel et al., 2008). Das dafür im Rahmen dieser Arbeit etablierte quantitative Nachweissystem beruht auf einer direkten cDNA-Synthese aus Einzelzellen. Es bietet dabei die Möglichkeit der getrennten Expressionsanalyse von

bis zu zehn Genen einer Zelle, was die Nutzung optimaler Reaktionsbedingungen für jedes Primerpaar und damit hohe PCR-Effizienzen ermöglicht. Eine gegenseitige Beeinflussung der PCR-Komponenten und -Produkte wie sie bei einer Multiplex-PCR auftreten kann, ist so ausgeschlossen. Der Wahl eines geeigneten internen Referenzgens kommt im Rahmen einer quantitativen PCR eine besonders große Bedeutung zu. Dieses sollte in Tumorzellen und normalen Zellen eines Patienten ähnlich stark exprimiert werden und auch zwischen verschiedenen Patienten nicht allzu sehr schwanken. Problematisch ist hierbei, dass sowohl Referenzgene als auch Marker Gene zirkulierender Tumorzellen verschiedenen Stimuli, wie z.B. dem Einfluss von Zytokinen unterliegen (Übersicht: Pantel et al., 2008). Besonders bei der Arbeit mit Probenmaterial von Patienten unter Therapie stellt dies ein bisher ungelöstes Problem dar. Für die quantitativen Expressionsanalysen im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst EEF1G (Eukaryotischer Elongationsfaktor 1 gamma) bzw. RPL13A (60S Ribosomales Protein L13A), welches bei der qualitativen RT-PCR verwendet wurde, als mögliche Referenzgene getestet. Während RPL13A zumindest von einem Teil der Zellen relativ stabil exprimiert wurde, konnte die Expression von EEF1G nicht reproduzierbar nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde weiterhin GUS-B auf seine Eignung als Referenzgen für diesen Versuchsansatz hin untersucht. Dieses, für die beta- Glukuronidase kodierende Gen weist keine Pseudogene auf und zeigt nur eine relativ geringe Variabilität seiner Expression bei verschiedenen Geweben sowie in Zellen solider Tumoren und hämatoonkologischer Malignomen (Aerts et al., 2004; Rubie et al., 2005; Beillard et al., 2003). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die medianen mRNA-Level von GUS-B in gesunden Brustgeweben und Brusttumoren nur sehr geringfügig voneinander unterscheiden (Trigarico, et al., 2002). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Expression von GUS-B in mehr als 80 % aller präparierten Zellen detektiert werden. Vor allem die im Vergleich zu den analysierten Zielgenen ähnliche Expressionshöhe machte es zum geeignetsten der untersuchten Referenzgene. Der Sonden-basierte qPCR-Ansatz wurde zunächst zum Nachweis von CD90 und FAP- α an verschiedenen Zellkulturzellen getestet. Es war dabei sowohl möglich, CD90- und FAP-exprimierende von nicht-exprimierenden Zellen zu unterscheiden als auch eine graduelle Einteilung vorzunehmen, die es ermöglicht innerhalb gleicher Zelltypen zu differenzieren. Dies schafft die Voraussetzung, zur vergleichenden Analyse von CD90-positiven und CD90-negativen Zellen aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten.

Nachdem also prinzipiell gezeigt werden konnte, dass CD90-positive Zellen in der Zirkulation von Tumorpatienten nachweisbar sind, sollte eine Quantifizierung der Zellen im Zeitverlauf unter Einbeziehung der klinischen Daten die Dynamik dieser Zellpopulation sowie ihren Bezug zur Entwicklung der Tumorerkrankung zeigen. Dazu wurden, aus den bereits beschriebenen Gründen, in erster Linie zufällig gewählte Mammakarzinompatientinnen über den Zeitraum von ungefähr einem Jahr beobachtet. Die parallele Bestimmung der Anzahl EpCAM-positiver Zellen sollte Hinweise über einen möglichen Zusammenhang zur Population potentiell zirkulierender Tumorzellen geben. Die Expression von EpCAM hat nachweislich in manchen Tumortypen einen negativen (z.B. Lymphknoten-positives Mammakarzinom, epitheliales Ovarialkarzinom), in den meisten einen neutralen und in anderen wiederum einen positiven (u.a. Magenkarzinom, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom) prognostischen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten (Baeuerle und Gires, 2007). Auch für die Detektion und Anreicherung zirkulierender Tumorzellen (CTCs) stellt EpCAM einen häufig verwendeten Marker dar. Klinische und molekularbiologische Studien konnten zeigen, dass CTCs in verschiedenen Stadien der Tumorprogression nachweisbar sind, wobei deren Anzahl u.a. mit der Tumormasse in Zusammenhang zu stehen scheint (Gasent Blesa et al., 2008). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die An- und Abwesenheit zirkulierender EpCAM-positiver Tumorzellen im Verlauf der individuellen Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms als prädiktiver Faktor für das Therapieansprechen fungieren kann (Pachmann et al., 2005; Tewes et al., 2009). So bietet die quantitative Erfassung zirkulierender Tumorzellen die Möglichkeit einer frühen Beobachtung des Therapieansprechens und zwar besonders in der adjuvanten Situation, für die es bislang keine alternative Möglichkeit gibt (Gasent Blesa et al., 2008). Ein ähnliches Potential wäre ebenso für in der Peripherie vorkommenden Tumorstroma-assoziierte Zellen vorstellbar. Das im Rahmen der CD90-Verlaufsanalysen untersuchte Patientenkollektiv umfasste 72 Patientinnen von denen insgesamt rund 300 Blutproben aufgearbeitet wurden. In ungefähr der Hälfte dieser Proben und 54 der Patientinnen waren CD90-positive Zellen nachweisbar. Deren absolute Anzahl lag dabei bei bis zu 54.000 pro ml. Auch in 39 % der untersuchten Normalblutproben konnten CD90-positive Zellen detektiert werden, jedoch lag deren Anzahl, mit Ausnahme einer bereits messtechnisch auffälligen Probe, unter 1000 pro ml. Yang und Kollegen charakterisierten in einer Studie Tumorstammzellen im Hepatozellulären Karzinom anhand der Expression von CD90. Dazu detektierten sie

zunächst verschiedene, differentiell exprimierte Stammzellmarker wie CD117 und CD133 in Zelllinien des Hepatozellulären Karzinoms, wobei nur die Expression von CD90 positiv mit deren Tumorigenität und Metastasierungseigenschaften korrelierte. Sie konnten CD90-positive Zellen außerdem in allen untersuchten Tumorgewebeproben und rund 92 % der Blutproben von Patienten mit einem Hepatozellulären Karzinom nachweisen. In den parallel analysierten Proben gesunder Kontrollpersonen fanden sie CD90-positive Zellen jedoch nur im Gewebe, nicht aber im peripheren Blut (Yang et al., 2008). Die Detektion der Zellen erfolgte dabei nach einer magnetischen Anreicherung mittels eines zusätzlichen Brückenantikörpers, die erfahrungsgemäß mit erhöhten Zellverlusten und einer geringeren Spezifität einhergeht. Dies könnte dafür verantwortlich sein, dass eine Anreicherung CD90-positiver Zellen aus peripherem Blut von Kontrollpersonen zu keinem Ergebnis führte. Auch das im Rahmen dieser Arbeit genutzte Separationsverfahren setzt aufgrund der vielfältigen anfallenden Präparationsschritte für eine erfolgreiche Isolierung eine Mindestzahl an Zielzellen voraus. Die Quantifizierung CD90-positiver Zellen im Verlauf erfolgte deshalb und auch aufgrund der geringeren Schwankungen an unsepariertem Patientenmaterial. Für 46 der Patientinnen konnten so mindestens drei Messungen generiert und eine nähere Betrachtung angestellt werden. Entsprechend der Anzahl an Proben, in denen eine Mindestzahl an CD90-positiven Zellen pro ml detektiert wurde und der maximalen Anzahl CD90-positiver Zellen, wurde in Anlehnung an die für die Normalblutproben erhaltenen Werte eine Klassifizierung der Patientinnen vorgenommen. Die Einordnung erfolgte dabei in die drei Kategorien 0, 1 und 2, wobei die Kategorie 0 mit einem seltenen Auftreten und geringen Zahlen CD90-positiver Zellen und die Kategorie 2 mit einem häufigen Auftreten und hohen Zahlen CD90-positiver Zellen assoziiert ist. Bei den 14 Fällen in den Kategorien 1 und 2 handelte es sich bis auf eine Ausnahme um Mammakarzinome. Dies deckt sich mit der Feststellung, dass aus Patientinnen mit dieser Tumorentität CD90-positive Zellen häufiger und in größerer Anzahl separiert werden konnten als aus anderen.

Anschließend galt es zu untersuchen, ob hohe Anzahlen CD90-positiver Zellen mit dem Auftreten von Metastasierungsereignissen einhergehen, d.h., ob Patientinnen in den Kategorien 1 und 2 häufiger davon betroffen sind. Allgemein war festzustellen, dass von Metastasierungsereignissen betroffene Patientinnen sowohl der Kategorie 0 als auch der Kategorie 2 zuzuordnen waren. Dabei war ihr Anteil an allen untersuchten Patientinnen in Kategorie 2 geringfügig höher als in Kategorie 0 (Faktor 1,5). Dies lässt vermuten, dass die

Anwesenheit CD90-positiver Zellen in der Zirkulation keine Voraussetzung für die Entstehung von Metastasen ist oder diese zwangsläufig zur Folge hat. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass besonders im Mammakarzinom zwischen den ersten Schritten der Metastasierungskaskade und der Diagnose einer manifesten Metastase ein sehr variables Zeitfenster liegt. Durch den im Rahmen dieser Arbeit zu verwirklichenden Untersuchungs- und Beobachtungszeitraum von ungefähr einem Jahr ist eine Einschätzung der Bedeutung CD90-positiver Zellen für den Metastasierungsprozess also nur eingeschränkt möglich. Weiterhin wäre es möglich, dass nicht die absolute Zahl an CD90-positiven Zellen ausschlaggebend ist, sondern vielmehr einzelne Zellen und ganz bestimmte Milieubedingungen über den weiteren Krankheitsverlauf entscheiden. So können auch Tumorzellen selbst schon Jahre vor der Entstehung von Metastasen z.B. im Knochenmark nachgewiesen werden, was zeigt, dass sich bei weitem nicht alle disseminierten Tumorzellen auch zu Metastasen entwickeln (Braun et al., 2005), sondern es sich hierbei um ein eher seltenes Ereignis handelt. Auch Nagrath und Kollegen konnten mit einem CTC-Chip hohe Zahlen an Zytokeratin-positiven Zellen in nahezu allen untersuchten Patienten mit Lungen-, Prostata-, Pankreas-, Mamma- und Kolonkarzinom identifizieren und zwar auch in nicht-metastasierten. Im Fall des Prostatakarzinoms wiesen diese sogar mehr CTCs auf, als solche mit diagnostizierten Metastasen (Nagrath et al., 2007). Die Ergebnisse der parallel durchgeführten Bestimmung EpCAM-positiver potentiell zirkulierender Tumorzellen zeigten in weniger als einem Viertel der Fälle einen ähnlichen Verlauf beider Zellpopulationen. In der Mehrheit der untersuchten Patientinnen änderte sich die Größe der Populationen EpCAM- und CD90-positiver Zellen jedoch unabhängig voneinander, wobei die Anzahl der CD90-positiven Zellen mehrheitlich unter der der EpCAM-positiven lag. In wenigen Fällen stieg zwischen bestimmten Messzeitpunkten die Anzahl der einen Zellpopulation an, während die der anderen abfiel. Ein direkt gekoppeltes Auftreten von EpCAM- und CD90-positiven Zellen ist daher als eher unwahrscheinlich einzuschätzen. Eine Abhängigkeit voneinander, was die erfolgreiche Absiedlung angeht, erscheint jedoch weiterhin möglich.

Bei der Betrachtung der CD90-Kategorisierung unter Berücksichtigung verschiedener Patienten- und Erkrankungs-spezifischer Parameter fiel auf, dass Patientinnen, die jünger als 40 Jahre waren fast ausschließlich der CD90-Kategorie 0 zuzuordnen waren, der Anteil der über 60-jährigen Patientinnen dagegen in Kategorie 2 am höchsten war. Während außerdem Tumorgroße bzw. Nodalstatus nicht direkt mit dem Auftreten zirkulierender

CD90-positiver Zellen assoziiert zu sein scheinen, zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem quantitativen Vorkommen CD90-positiver Zellen in der Peripherie und der Gradingstufe des Primärtumors. Während Tumoren der Patientinnen der Kategorie 2 bis auf eine Ausnahme nur noch gering differenziert waren (Gradingstufe 3), waren mehr als 65 % der Tumoren in Kategorie 0 noch mäßig differenziert, was mit einer besseren Prognose einhergeht. In der bereits erwähnten Studie von Yang und Kollegen über die Bedeutung CD90-positiver Zellen im Hepatozellulären Karzinom zeigte sich diesbezüglich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl CD90-positiver Zellen im Gewebe bzw. Blut und dem Alter der Patienten bzw. dem Tumorgrading und -staging (Yang et al., 2008).

Ein anderer allgemein zu berücksichtigender Aspekt bei der Erfassung bestimmter Zellpopulationen in Tumorpatienten ist der nicht zu unterschätzende Einfluss von Chemotherapeutika. Diese Substanzen wirken in unterschiedlichem Umfang auf alle sich schnell regenerierenden Zellen und Gewebe toxisch und beeinflussen so neben den Tumorzellen u.a. auch die Hämatopoese. Es wird weiterhin angenommen, dass Elemente des Tumorstromas aufgrund ihrer höheren genetischen Stabilität selbst weniger anfällig für die Entwicklung von Therapieresistenzen sind als die Tumorzellen, dafür aber wesentlich zur Vermittlung dieser beitragen (Übersicht: Udagawa und Wood, 2010). So konnten Farmer und Kollegen in Mikroarray-Studien zeigen, dass eine mit einem reaktiven Stroma assoziierte Gensignatur im Mammakarzinom mit einer neoadjuvanten Chemotherapieresistenz gegen 5-Fluorouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid (FEC) einhergeht. In der Folge könnte ein Screening diesbezüglich genutzt werden, um Rückschlüsse über Krankheitsverlauf und Therapieansprechen zu ziehen (Farmer et al., 2009). Inwiefern diese Ergebnisse auch aus zirkulierenden Tumor-assoziierten Stromazellen oder deren Vorläuferzellen gezogen bzw. auf diese übertragen werden können bleibt zu untersuchen. Für eine Beurteilung der Ergebnisse hinsichtlich dieser Thematik wurden die Patientinnen herangezogen, bei denen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten ein ausreichend großer zeitlicher Abstand lag oder ein Therapiewechsel erfolgte bzw. die Therapie abgeschlossen wurde. Während es unter Therapie meist zu einem Abfall der Zellzahl kam, führte ein Therapiewechsel zu einer tendenziellen Änderung im Verhalten der CD90-positiven Zellen bzw. das Therapieende zu deren erneuter Zunahme. Dies lässt zumindest auf eine teilweise Beeinflussbarkeit der Population CD90-positiver Zellen im Rahmen einer Antitumor-Therapie schließen, die

mitverantwortlich sein könnte für das häufig beobachtete Ansteigen und Abfallen der Anzahl CD90-positiver Zellen während des Beobachtungszeitraums. In der bereits erwähnten Untersuchung von Jiang und Kollegen bezüglich einer CD90-positiven Tumorstammzellpopulation im Magenkarzinom führte eine Behandlung der hoch tumorigenen Magentumoren mit Trastuzumab, einem gegen HER-2/neu gerichteten humanisierten monoklonalen Antikörper, zur Verkleinerung der Population an CD90-positiven Zellen und in Kombination mit einer traditionellen Chemotherapie zur Unterdrückung des Tumorwachstums (Jiang et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit war ein direkter Zusammenhang zum jeweilig angewandten Therapieregime aufgrund der geringen Fallzahl jedoch nicht sicher feststellbar und dürfte außerdem, wie auch das allgemeine Ansprechen auf Chemotherapeutika, einer sehr individuellen Komponente unterliegen.

Die Einordnung dieser Ergebnisse in den Gesamtkontext wird vor allem durch die große Heterogenität der Population Tumor-assoziiierter Fibroblasten (TAFs) erschwert, welche hauptsächlich auf die vielfältige Herkunft der Zellen zurückzuführen sein dürfte. So haben Studien an Maustumoren bezüglich dieses Aspekts gezeigt, dass immer nur ein Teil der TAFs den gleichen Ursprung aufweist. Dies legt nahe, dass TAFs allgemein nicht aus einer Quelle stammen, sondern von verschiedenen Zellpopulationen abgeleitet werden können. Belege für die Herkunft Tumor-assoziiierter Fibroblasten in humanen Tumoren und besonders Metastasen gibt es noch immer wenige. In einer Studie über CD90-positive Zellen im Hepatozellulären Karzinom postulierten die Autoren, dass CD90-positive Zellen des Gewebes eine Quelle für die entsprechenden Zellen in der Zirkulation darstellen. Grundlage dafür waren die Beobachtungen, dass bei Patienten mit einem größeren Tumor auch mehr CD90-positive Zellen in der Peripherie vorkamen und, dass nach einer Leberresektion die Anzahl der Zellen in der Zirkulation zurückging (Yang et al., 2008). Da es also durchaus denkbar ist, dass auch im Mammakarzinom ein Teil der Stromazellen in der Zirkulation ursprünglich vom Primärtumor stammt, sollten Analysen der CD90-Positivität und des Stromagehalts an Primärtumormaterial mögliche Parallelen zum quantitativen Vorkommen CD90-positiver Zellen in der Peripherie liefern. Hierzu wurde Paraffinmaterial von neun Patientinnen, die im Rahmen der CD90-Verlaufsuntersuchungen unterschiedlichen Parameter bezüglich des Vorkommens CD90-positiver Zellen in der Zirkulation aufwiesen, mittels Immunhistochemie untersucht. Das Primärtumorgewebe zeigte dabei wider Erwarten bei den meisten Mammakarzinompatientinnen einen als eher gering einzuschätzenden Stromaanteil an der Tumormasse. Das Präparat einer in der Milz

lokalisierten Metastase eines Ovarialkarzinoms hingegen zeigte die ausgeprägtesten Stromakomponenten. Der Nachweis von CD90 konnte dabei wie erwartet im fibroblastären Stroma, aber auch im Bereich von Entzündungsreaktionen, am Übergang zum Fettgewebe sowie rund um Gefäße erbracht werden. Die Intensität der CD90-Färbung variierte dabei nicht nur zwischen den Präparaten verschiedener Patientinnen, sondern auch innerhalb verschiedener Tumor-Stroma-Areale eines Tumors. Bei einigen Präparaten war außerdem eine schwache CD90-Positivität der Tumorzellen festzustellen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von Donnenberg und Kollegen bezüglich eines Zusammenhangs zwischen der Expression von CD90 und CD44 als potentiellen Markern zur Identifizierung von Brustkrebsstammzellen. Sie konnten zeigen, dass alle Tumoren eine kleine Population CD44/CD90 doppelt positiver Zellen enthalten, die den Phänotyp duktal basaler Zellen nachahmen. Diese zum Teil hoch tumorigenen Zellen sind an der Tumorperipherie, angrenzend an das CD90-positive Stroma lokalisiert. CD90 war dabei sowohl membranständig als auch im Zytoplasma zu finden und zwar ebenfalls auf intratumoralen CD44-negativen Stromazellen und auf kleinen Gefäßen, wo es mesenchymale Stammzellen markiert. Innerhalb von Tumornestern fand sich die ausgeprägteste CD90-Expression auf Zytokeratin-negativen Fibroblasten, die die Tumorkapsel umgeben. In der Tumorperipherie tendierten die CD90-positiven Zellen dazu, eine Doppelschicht, mit ununterbrochenen fibroblastären Zellen auf der Außenseite und einzelnen oder kleinen Clustern von epitheloiden Tumorzellen auf der Innenseite, zu bilden. Während der Zellreifung bewegen sich die Zellen dann zum Lumen und neigen dazu, die CD90-Expression zu verlieren und die Expression von Zytokeratin zu erlangen. Was die biologische Bedeutung dieser Zellen betrifft, so konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine Subpopulation kleiner CD90-positiver Zellen mit hoher Granularität tumorigenes Potential besitzt (Donnenberg et al., 2010). Für die Beurteilung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der CD90-Positivität des Primärtumors und der Anzahl CD90-positiver Zellen in der Zirkulation wurden die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tumorgewebe-Präparate, wie auch die Blutproben, anhand einer Skala von null bis zwei beurteilt. Eine direkte Korrelation beider Parameter konnte dabei jedoch nicht nachgewiesen werden, was aber möglicherweise ebenso auf die geringe Fallzahl zurückzuführen sein könnte. Bezüglich des Zusammenhangs zu Patienten- und Tumorspezifischen Parametern lassen sich daher auch nur Tendenzen erkennen. So scheinen eine höhere Gradingstufe und ein höheres Patientenalter mit einer ausgeprägteren

CD90-Gewebe positivität assoziiert zu sein, als geringere Gradingstufen und ein niedrigeres Patientenalter. Keinen Einfluss scheinen hingegen die Tumorgröße und der Nodalstatus zu haben. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Verlaufsuntersuchungen am peripheren Blut und auch mit den Beobachtungen anderer Studien. So konnten Lu und Kollegen zeigen, dass das CD90-Expressionslevel im Hepatozellulären Karzinom mit dem Patientenalter, dem Vorliegen einer Hepatitis-B-Virus-Infektion sowie dem histologischen Grading, nicht aber der Tumorgröße korreliert ist. Patienten mit der höchsten CD90-Expression wiesen dabei außerdem die schlechtesten Überlebensprognosen auf (Lu et al., 2011).

Bezüglich der beobachteten Gefäß-assoziierten CD90-Expression beschrieben bereits Jurisic und Kollegen die Expression von CD90 in lymphatischen Gefäßen und aktivierten Blutgefäßen, wo es potentiell an Zelladhäsionsprozessen beteiligt ist, die im Rahmen der Immunabwehr und bei Metastasierungseignissen eine wichtige Rolle spielen. CD90 wurde dabei sowohl von CD31-positiven Gefäßen als auch von Fibroblasten exprimiert, die diese direkt umgeben (Saalbach et al., 2002; Jurisic et al., 2010). Zur Klärung, ob es sich bei den in der Zirkulation detektierten CD90-positiven Zellen möglicherweise um Gefäß- oder Gefäßvorläuferzellen handelt, wurden Fluoreszenz-basierte Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Koexpression von CD90 und dem Gefäßendothelzellmarker CD31 an peripherem Blut und Knochenmarkpunktionsmaterial durchgeführt. Die dabei gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass der Nachweis zirkulierender potentieller Gefäß- und Gefäßvorläuferzellen prinzipiell möglich ist, dass die im Rahmen der CD90-Verlaufbeobachtungen an Patientinnen mit gynäkologischen Tumoren detektierten Zellen jedoch nicht dazu gehören. Da sich im Rahmen der immunhistochemischen Analysen kein direkter Zusammenhang zwischen dem Stromagehalt der Tumorgewebeproben und dem Vorkommen CD90-positiver Zellen im peripheren Blut erkennen ließ, scheint sich zumindest anzudeuten, dass der Primärtumor keine oder zumindest nicht die alleinige Quelle dieser Zellpopulation darstellt. Das außerdem zahlenmäßig von der Anwesenheit des Primärtumors unabhängige Vorkommen CD90-positiver Zellen scheint dies zu bestätigen, könnte aber auch ein Indiz für Parallelen zum Verhalten der zirkulierenden Tumorzellen sein. So konnte gezeigt werden, dass EpCAM-positive Zellen im peripheren Blut von Brustkrebspatientinnen auch noch Monate und Jahre nach Entfernung des Primärtumors nachweisbar sind (Meng et al., 2004; Pachmann, 2005). Das Knochenmark scheint dabei aufgrund seiner Milieueigenschaften ein wichtiges Reservoir für Tumorzellen

vieler Tumorentitäten zu sein (Übersicht: Pantel et al., 2008). In diesem Kontext gibt es mittlerweile auch zunehmend Hinweise darauf, dass Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Tumor invadieren und als TAFs fungieren ((Übersicht: Li et al., 2007) bzw. an der Formation der prä-metastatischen Nische beteiligt sind (Kaplan et al., 2005). Eine Rolle des bereits beschriebenen Zytokins SCF (Stammzellfaktors), welches biologische Effekte wie die Proliferation, Differenzierung und Mobilisierung von Stamm- und Vorläuferzellen vermittelt und dessen Expression in 81 % der analysierten CD90-positiven Zellen detektiert werden konnte, wäre auch in diesem Zusammenhang durchaus denkbar. Es ist dabei unklar, ob diese dann durch die vor Ort herrschenden Milieubedingungen aktiviert werden oder ob es sich um eine Subpopulation von Knochenmarkszellen handelt, die bereits einen aktivierten Phänotyp aufweisen und vorzugsweise zur Stelle des Primärtumors rekrutiert werden (Übersicht: Li et al., 2007). Aus dem Knochenmark stammende Zellen lassen sich allgemein in hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen einteilen. Letztere scheinen nach der frühen Entwicklung vor allem im Zuge von chronischen Entzündungen und Gewebeumbauprozessen ins jeweilige Zielgewebe zu gelangen. Die Rekrutierung aus dem Knochenmark ins Tumorgewebe bzw. in prä-kanzeröses Gewebe erscheint daher auch als weitere Parallele zur Wundheilung (Übersicht: Gonda et al., 2010). Ähnlich zur Fähigkeit der Tumorzellen ortsständige Fibroblasten und Myofibroblasten in Tumor-fördernde Fibroblasten zu transformieren, konnte gezeigt werden, dass vom Tumor freigesetzte lösliche Faktoren bzw. eine direkte Kokultivierung den Übergang mesenchymaler Stammzellen hin zu einem fibroblastären Phänotyp steuern (Übersicht: Gonda et al., 2010). Direkze und Kollegen konnten an einem Mausmodell des Pankreaskarzinoms zeigen, dass Zellen aus dem Knochenmark zu schätzungsweise einem Viertel zur Population an Fibroblasten und Myofibroblasten beitragen und sich dabei am Tumorrand konzentrieren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Entwicklung des Tumormikroenvironments, zumindest in Teilen, eine systemische Antwort ist. Unklar bleibt, ob es sich dabei um einen Mechanismus im Rahmen der Wirtsabwehr oder um eine vom Tumor gesteuerte Zellrekrutierung handelt (Direkze et al., 2004). Sangai und Kollegen zeigten weiterhin, dass es sich dabei um ein generelles Phänomen handelt. Sie untersuchten in diesem Zusammenhang die Rekrutierung von Myofibroblasten und vaskulären, endothelialen Zellen aus dem Knochenmark in aus verschiedenen Zelllinien generierte Xenograft-Tumoren unter Berücksichtigung der Parameter Tumolvolumen und Stromagehalt. Der höchste durchschnittliche Anteil von aus

dem Knochenmark-rekrutierten Myofibroblasten am Stroma lag dabei zwischen 25 und 35 % und korrelierte mit dem Gesamtstromaanteil am Tumor. Die Pankreaszelllinie Capan-1 wurde außerdem subkutan und in verschiedene Organe implantiert. Die jeweils entstandenen Tumoren wiesen sowohl verschiedene Morphologien als auch unterschiedliche Stromaanteile und Mengen aus dem Knochenmark rekrutierter Zellen auf. Dies zeigt, dass nicht der Charakter der Tumorzellen, sondern vielmehr das jeweilige Milieu die Ausprägung der Stromareaktion bestimmt (Sangai et al., 2005). Der Anteil aus dem Knochenmark-abgeleiteter und ins Stroma einwandernder Myofibroblasten scheint dabei in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung zuzunehmen (Übersicht: Desmouliere et al., 2004). Auch im Rahmen der experimentellen Untersuchung von Metastasierungsprozessen konnte beobachtet werden, dass bestimmte Tumoren die Mobilisierung von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark induzieren, welche dann eine prä-metastatische Nische formen und die Entwicklung von zirkulierenden Zellen fördern (Kaplan et al., 2005). Weitere Analysen von Serum und Knochenmark von Brustkrebspatientinnen gaben aber ebenfalls Hinweise darauf, dass diese Prozesse auch in endogenen humanen Tumoren stattfinden (Kerbel et al., 2008; Shaked et al., 2008). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass sich aus dem Knochenmark isolierte und intravenös applizierte mesenchymale Stammzellen nicht nur am Ort solider mikroskopischer Tumoren, sondern auch gemeinsam mit Tumorzellen ansiedeln (Studený et al., 2002; Hung et al., 2005). Studený und Kollegen beschrieben weiterhin, dass diese stromalen Vorläuferzellen als zelluläre Vehikel sowohl für die Verteilung als auch für die lokale Produktion biologischer Substanzen dienen können (Studený et al., 2004). Dieser Ansatz könnte dazu verwendet werden, unter Umgehung der Toxizität systemischer Applikationen, gezielt das extrazelluläre Milieu maligner Zellen zu beeinflussen. Während also schon vielfach gezeigt werden konnte, dass humanes Knochenmark mesenchymale Stammzellen enthält, ist jedoch wenig bekannt über deren Anwesenheit im peripheren Blut. Da diese Zellen potentiell für Gewebereparaturprozesse mitverantwortlich sind, sollte deren Anzahl im Rahmen solcher Ereignisse ansteigen. Mansilla und Kollegen untersuchten in diesem Zusammenhang peripheres Blut von gesunden Spendern und Patienten mit Brandverletzungen auf die Anwesenheit von mesenchymalen Stammzellen, welche über die Expression von CD44, CD13, CD29, CD90 und CD105 definiert wurden. Unter normalen Umständen kommen mesenchymale Stammzellen im peripheren Blut nur in minimaler Konzentration vor. Nach traumatischen

Bedingungen, wie im Fall von Brandwunden, erhöht sich deren Anzahl in diesem Kompartiment signifikant, was nur durch eine Freisetzung aus dem Knochenmark erklärbar ist. Diese scheint dabei mit Größe und Schweregrad der Verbrennung zu korrelieren. In Bezug auf neoplastische Erkrankungen, die auch als sog. „nicht-heilende Wunden“ beschrieben sind (Dvorak, 1986), könnten mesenchymale Stammzellen mittels ähnlicher Mechanismen stromale und angiogene Elemente zur Aufrechterhaltung des Tumorwachstums zur Verfügung stellen (Mansilla et al., 2006). Humane mesenchymale Stammzellen stellen aufgrund ihrer Multipotenz und der Rekrutierung und Beeinflussung von Reparatur- und Regenerationsprozessen im Fall schwerer Gewebsverletzungen auch ein vielversprechendes Werkzeug in der klinischen Applikation dar. Bezüglich der in vitro Markerexpression wurden von der International Society for Cellular Therapy (ISCT) u.a. CD90 und CD105 vorgeschlagen (Turnovcova et al., 2009).

Ein im Rahmen der Stammzellthematik ebenfalls diskutierter Aspekt sind die sog. Tumorstammzellen, eine spezifische Subpopulation von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften, die für Initiation, Progression und Rekurrenz von Tumorerkrankungen verantwortlich sein könnte (Übersicht: Campbell und Polyak, 2007). Tumorstammzellen wurden bereits in verschiedenen humanen Krebserkrankungen, u.a. dem Mammakarzinom, beschrieben. Bei Oberflächenmarkern, die im Zusammenhang mit Stammzeleigenschaften beschrieben werden, handelt es sich z.B. um CD133, CD44 und CD24 (Übersicht: Oliveira et al., 2010). So identifizierten Al-Hajj und Kollegen eine putative Population Stammzell-ähnlicher, CD44-positiver, CD24-negativer Brusttumorzellen (Al-Hajj et al., 2003). In epithelialen Tumoren z.B. der Lunge oder der Brust wurde außerdem CD90 als Marker für Tumorstamm- und Tumorstammvorläuferzellen vorgeschlagen (Donnenberg et al., 2006, 2007). Daten von Aktas und Kollegen liefern zudem Hinweise auf eine Subpopulation zirkulierender Tumorzellen im metastasierten Mammakarzinom, die Tumorstammzell-Eigenschaften aufweist und für das metastatische Potential verantwortlich sein könnte. Die damit verbundene Markerexpression könnte unter Umständen als Indikator für therapieresistente Tumorstammzellpopulationen und damit eine schlechtere Prognose dienen (Aktas et al., 2009). Obwohl Tumorstammzellen nur einen sehr kleinen Anteil der Tumormasse ausmachen, scheinen sie doch wesentlich an der Vermittlung von Therapieresistenzen beteiligt zu sein. Dies macht deutlich, dass vor allem auf dem Gebiet der Behandlung von Tumorerkrankungen noch viel Handlungsbedarf besteht. Einen Fortschritt könnten hier gegen das Tumorstroma gerichtete Therapieansätze

bedeuten. Diese dürften zum einen eine effektivere und länger anhaltende Antwort hervorrufen, da die Stromazellen, im Gegensatz zum genetisch diversen, instabilen Genom epithelialer Tumorzellen, eine relativ normale, genetisch stabile Konstitution haben (Übersicht: Elenbaas und Weinberg, 2001). Zum anderen können derartige Strategien jedoch nur ein weiteres Fortschreiten der Erkrankung verhindern, nicht aber zum Tod der Tumorzellen führen. Aus diesem Grund sollten Ansätze, die auf Stromazellen und deren heterotypischen Interaktionen basieren mit zytotoxischen Therapien gegen Tumorzellen kombiniert werden (Übersicht: Elenbaas und Weinberg, 2001). Die Identifizierung und Charakterisierung der genomischen, epigenomischen und funktionellen Rolle des Tumormikroenvironments sollte somit langfristig einen Fortschritt in der Onkologie hin zur maßgeschneiderten Therapie darstellen (Eng et al., 2009). So konnte bereits gezeigt werden, dass somatische TP53-Mutationen im Mammakarzinom zwar mit der Entstehung regionaler Lymphknotenmetastasen assoziiert sind (Patocs et al., 2007), dass TP53-Mutationen in dessen Stromafibroblasten jedoch zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber Doxorubicin und Cisplatin führen (Lafkas et al., 2008). Diese und ähnliche Beobachtungen könnten so die Wahl des zur Anwendung kommenden Chemotherapeutikums und damit auch den Therapieerfolg mit beeinflussen. Eine weitere Hürde in diesem Zusammenhang stellt die bislang nur retrospektiv mögliche Beurteilung des Therapieansprechens anhand der Entstehung von Metastasen dar. Da die Heilungschancen dann aber nur noch minimal sind, stellt die Beobachtung von zirkulierenden Tumorzellen in Blut und Knochenmark während systemischer, adjuvanter Therapie eine wertvolle Informationsquelle für die individuelle Patientenbehandlung dar. Außerdem konnte sowohl in frühen als auch in aktuellen in vivo und in vitro Studien wiederholt gezeigt werden, dass invasive Mammakarzinome von umgebenden Stromazellen, wie Fibroblasten, hinsichtlich Wachstum und Differenzierung entscheidend beeinflusst werden (DeCosse et al., 1973, 1975; Bissel und Radisky, 2001; Radisky et al., 2001; Tlsty, 2001). Dabei stellt sich u.a. die Frage, ob Stromazellen mit den Tumorzellen kometastasieren, oder ob sich ihr Effekt auf den Ort des Primärtumorwachstums beschränkt. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein neues, klonal selektiertes genetisch abnormales stromales Mikroenvironment an jedem Metastasierungsort neu entsteht, erscheint dabei sehr gering und in der Tat sind im Mammakarzinom bestimmte Metastasierungsorte wie Lymphknoten und das Gehirn weitestgehend frei von Tumor-assoziierten Fibroblasten (Übersicht: Polyak et al., 2009). Eine Kometastasierung oder die

Rekrutierung entsprechender Vorläuferzellen aus dem Knochenmark an den Metastasierungsort erscheint daher wahrscheinlich. In beiden Fällen würden diese Zellen für einen bestimmten Zeitraum in der Zirkulation vorkommen, der mitunter sogar noch vor dem der zirkulierenden Tumorzellen liegen könnte. Während zirkulierende Tumorzellen in Blut und Knochenmark erstmals 2007 in einer Tumormarkerempfehlung der Amerikanischen Gesellschaft für klinische Onkologie (ASCO) erwähnt wurden (Harris et al., 2007), gibt es zur möglichen Rolle Tumor-assoziiierter Stromazellen aber bislang nur wenig Anhaltspunkte. Ursächlich dafür ist wohl u.a. die Schwierigkeit, spezifische und universell anwendbare Marker für diese doch sehr heterogene Zellpopulation zu definieren. Das im Rahmen dieser Arbeit diesbezüglich untersuchte Molekül CD90 bietet den Vorteil, dass es Fibroblasten, und zwar unabhängig vom Aktivierungsgrad, und Zellen mit Stammzell-assoziierten Eigenschaften gleichermaßen erkennt. Desweiteren deutet die detektierte Koexpression mit anderen, in diesem Zusammenhang beschriebenen Markern wie CD44, Gremlin und SCF auf deren tumorigenes Potential und eine Rolle dieser Zellen während der Tumorprogression hin. Die in einem Teil der Mammakarzinompatientinnen, nicht aber in Patienten urologischer Tumoren und gesunden Kontrollpersonen gefundenen hohen Zellzahlen sprechen weiterhin für ein, wahrscheinlich Entitäts-abhängiges, Tumorerkrankungs-assoziiertes Auftreten dieser Zellpopulation. Der bisher nicht beobachtete Zusammenhang zum Ereignis-freien bzw. Gesamtüberleben dürfte in erster Linie auf die diesbezüglich geringe Fallzahl und den kurzen Nachbeobachtungszeitraum zurückzuführen sein. Auch die in diesem Zusammenhang recht großen Abstände der Nachuntersuchungen und das schlecht zu charakterisierende Zeitfenster zwischen den ersten Schritten der Metastasierungskaskade und der Diagnose einer manifesten Metastase erschweren die Einschätzung der Bedeutung CD90-positiver Zellen. Auch im Hinblick auf die viel diskutierte Herkunft der Tumor-assoziierten Fibroblasten sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für eine Mischpopulation von Zellen verschiedener Abstammung. Dabei scheinen vor allem über das Knochenmark rekrutierte Zellen auf dem Weg zur prä-metastatischen Nische die Blutbahn zu nutzen, aber auch ein Anteil vom Primärtumor freigesetzter Stromazellen ist weiterhin denkbar. Umso wichtiger ist die nähere Charakterisierung dieser heterogenen Zellpopulation hinsichtlich der Expression anderer, das tumorigene Potential mitbestimmender Marker wie CD44. Langfristiges Ziel ist es daher, ein Set multipler Marker in CD90-positiven Zellen zu etablieren, welches die Identifizierung der Zellen erlaubt, die über Prognose und Therapieerfolg entscheiden.

Quellenverzeichnis

Aerts JL, Gonzales MI, Topalian SL (2004)

Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques*. 36(1):84-86,88,90-91

Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S (2009)

Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 11(4):R46

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003)

Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(7):3983-3988

Anderberg C, Pietras K (2009)

On the origin of cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle*. 8(10):1461-1462

Arendt LM, Rudnick JA, Keller PJ, Kuperwasser C (2010)

Stroma in breast development and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 21(1):11-18. Review

Ashworth TR (1869)

A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aus Med J*. 14:146-149

Baeuerle PA, Gires O (2007)

EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer*. 96(3):417-423. Review

Baglolle CJ, Ray DM, Bernstein SH, Feldon SE, Smith TJ, Sime PJ, Phipps RP (2006)

More than structural cells, fibroblasts create and orchestrate the tumor microenvironment. *Immunol Invest*. 35(3-4):297-325. Review

Barker TH, Hagood JS (2009)

Getting a grip on Thy-1 signaling. *Biochim Biophys Acta*. 1793(5):921-923. Mini-Review

Beacham DA, Cukierman E (2005)

Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol*. 15(5):329-341. Review

Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJ, Hokland P, Gabert J (2003)

Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*. 17(12):2474-2486

Bissell MJ, Radisky D (2001)

Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 1(1):46-54. Review

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998)

Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 279(5349):349-352

Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K (2005)

A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*. 353(8):793-802

Broudy VC (1997)

Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*. 90(4):1345-1364. Review

Campbell LL, Polyak K (2007)

Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*. 6(19):2332-2338. Review

Cheng JD, Weiner LM (2003)

Tumors and their microenvironments: tilling the soil. Commentary re: A. M. Scott et al., A Phase I dose-escalation study of sibrotuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clin. Cancer Res*. 9:1639-1647. *Clin Cancer Res*. 9(5):1590-1595

Cho RW, Wang X, Diehn M, Shedden K, Chen GY, Sherlock G, Gurney A, Lewicki J, Clarke MF (2008)

Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors. *Stem Cells*. 26(2):364-371

Clement JH, Schwalbe M, Buske N, Wagner K, Schnabelrauch M, Görnert P, Kliche KO, Pachmann K, Weitschies W, Höffken K (2006)

Differential interaction of magnetic nanoparticles with tumor cells and peripheral blood cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 132(5):287-292

Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM (1993)

Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med*. 177(5):1331-1342

Curtis KM, Gomez LA, Rios C, Garbayo E, Raval AP, Perez-Pinzon MA, Schiller PC (2010)

EF1alpha and RPL13a represent normalization genes suitable for RT-qPCR analysis of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *BMC Mol Biol*. 11:61

DeCosse JJ, Gossens CL, Kuzma JF, Unsworth BR (1973)

Breast cancer: induction of differentiation by embryonic tissue. *Science*. 181(104):1057-1058

DeCosse JJ, Gossens C, Kuzma JF, Unsworth BR (1975)

Embryonic inductive tissues that cause histologic differentiation of murine mammary carcinoma in vitro. *J Natl Cancer Inst*. 54(4):913-922

Dennis JE, Esterly K, Awadallah A, Parrish CR, Poynter GM, Goltry KL (2007)

Clinical-scale expansion of a mixed population of bone-marrow-derived stem and progenitor cells for potential use in bone-tissue regeneration. *Stem Cells*. 25(10):2575-2582

Desmoulière A, Guyot C, Gabbiani G (2004)

The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol*. 48(5-6):509-517. Review

Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA (2004)

Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res*. 64(23):8492-8495

Donnenberg VS, Luketich JD, Landreneau RJ, DeLoia JA, Basse P, Donnenberg AD (2006)

Tumorigenic epithelial stem cells and their normal counterparts. *Ernst Schering Found Symp Proc*. (5):245-263. Review

Donnenberg VS, Landreneau RJ, Donnenberg AD (2007)

Tumorigenic stem and progenitor cells: implications for the therapeutic index of anti-cancer agents. *J Control Release*. 122(3):385-391

Donnenberg VS, Donnenberg AD, Zimmerlin L, Landreneau RJ, Bhargava R, Wetzel RA, Basse P, Brufsky AM (2010)

Localization of CD44 and CD90 positive cells to the invasive front of breast tumors. *Cytometry B Clin Cytom*. 78(5):287-301

Dutsch-Wicherek M (2010)

RCAS1, MT, and vimentin as potential markers of tumor microenvironment remodeling. *Am J Reprod Immunol*. 63(3):181-188. Review

Dvorak HF (1986)

Tumors: wounds that do not heal Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 315(26):1650-1659

Elenbaas B, Weinberg RA (2001)

Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res*. 264(1):169-184. Review

Eng C, Leone G, Orloff MS, Ostrowski MC (2009)

Genomic alterations in tumor stroma. *Cancer Res.* 69(17):6759-6764

Erler JT, Weaver VM (2009)

Three-dimensional context regulation of metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 26(1):35-49. Review

Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Becette V, André S, Piccart M, Campone M, Brain E, Macgrogan G, Petit T, Jassem J, Bibeau F, Blot E, Bogaerts J, Aguet M, Bergh J, Iggo R, Delorenzi M (2009)

A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med.* 15(1):68-74

Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M (2003)

Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. *Oncogene.* 22(42):6557-6563. Review

Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW (2010)

Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 21(1):33-39. Review

Gasent Blesa JM, Alberola Candel V, Esteban González E, Vidal Martínez J, Gisbert Criado R, Provencio Pulla M, Laforga Canales J, Pachmann K (2008)

Circulating tumor cells in breast cancer: methodology and clinical repercussions. *Clin Transl Oncol.* 10(7):399-406. Review

Gonda TA, Varro A, Wang TC, Tycko B (2010)

Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy? *Semin Cell Dev Biol.* 21(1):2-10. Review

Haeryfar SM, Hoskin DW (2004)

Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J Immunol.* 173(6):3581-3588. Review

Hanahan D, Weinberg RA (2000)

The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1):57-70. Review

Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr; American Society of Clinical Oncology (2007)

American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol.* 25(33):5287-5312. Review

Hawsawi NM, Ghebeh H, Hendrayani SF, Tulbah A, Al-Eid M, Al-Tweigeri T, Ajarim D, Alaiya A, Dermime S, Aboussekhra A (2008)

Breast carcinoma-associated fibroblasts and their counterparts display neoplastic-specific changes. *Cancer Res.* 68(8):2717-2725

Henniker AJ (2001)

CD90. *J Biol Regul Homeost Agents*. 15(4):392-393. Review

Hofmeister V, Schrama D, Becker JC (2008)

Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma. *Cancer Immunol Immunother*. 57(1):1-17. Review

Hung SC, Deng WP, Yang WK, Liu RS, Lee CC, Su TC, Lin RJ, Yang DM, Chang CW, Chen WH, Wei HJ, Gelovani JG (2005)

Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res*. 11(21):7749-7756

Jesnowski R, Backhaus C, Ringel J, Löhr M (2002)

Ribosomal highly basic 23-kDa protein as a reliable standard for gene expression analysis. *Pancreatology*. 2(4):421-424

Jiang J, Zhang Y, Chuai S, Wang Z, Zheng D, Xu F, Zhang Y, Li C, Liang Y, Chen Z (2011)

Trastuzumab (herceptin) targets gastric cancer stem cells characterized by CD90 phenotype. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2011.282

Juriscic G, Iolyeva M, Proulx ST, Halin C, Detmar M (2010)

Thymus cell antigen 1 (Thy1, CD90) is expressed by lymphatic vessels and mediates cell adhesion to lymphatic endothelium. *Exp Cell Res*. 316 (17):2982-2992

Kalluri R, Zeisberg M (2006)

Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 6(5):392-401. Review

Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D (2005)

VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 438(7069):820-827

Kerbel RS, Benezra R, Lyden DC, Hattori K, Heissig B, Nolan DJ, Mittal V, Shaked Y, Dias S, Bertolini F, Rafii S (2008)

Endothelial progenitor cells are cellular hubs essential for neoangiogenesis of certain aggressive adenocarcinomas and metastatic transition but not adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(34):E54

Kopfstein L, Christofori G (2006)

Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell Mol Life Sci*. 63(4):449-468. Review

Koumas L, Smith TJ, Feldon S, Blumberg N, Phipps RP (2003)

Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes. *Am J Pathol.* 163 (4):1291-1300

Krebs in Deutschland 2005/2006 (2010)

Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin

Kren A, Baeriswyl V, Lehembre F, Wunderlin C, Strittmatter K, Antoniadis H, Fässler R, Cavallaro U, Christofori G (2007)

Increased tumor cell dissemination and cellular senescence in the absence of beta1-integrin function. *EMBO J.* 26(12):2832-2842

Kunz-Schughart LA, Knuechel R (2002)

Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol.* 17(2):599-621. Review

Lafkas D, Trimis G, Papavassiliou AG, Kiaris H (2008)

P53 mutations in stromal fibroblasts sensitize tumors against chemotherapy. *Int J Cancer.* 123(4):967-971

Lazard D, Sastre X, Frid MG, Glukhova MA, Thiery JP, Koteliansky VE (1993)

Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(3):999-1003

Li H, Fan X, Houghton J (2007)

Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem.* 101(4):805-815. Review

Lozzio CB, Lozzio BB (1975)

Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 45:321-334

Lu JW, Chang JG, Yeh KT, Chen RM, Tsai JJ, Hu RM (2011)

Overexpression of Thy1/CD90 in human hepatocellular carcinoma is associated with HBV infection and poor prognosis. *Acta Histochem.* doi: 10.1016/j.acthis.2011.01.001

Mansilla E, Marín GH, Drago H, Sturla F, Salas E, Gardiner C, Bossi S, Lamonega R, Guzmán A, Nuñez A, Gil MA, Piccinelli G, Ibar R, Soratti C (2006)

Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant Proc.* 38(3):967-969

Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J, Uhr JW (2004)

Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res.* 10(24):8152-8162

Mersmann M, Schmidt A, Rippmann JF, Wüest T, Brocks B, Rettig WJ, Garin-Chesa P, Pfizenmaier K, Moosmayer D (2001)

Human antibody derivatives against the fibroblast activation protein for tumor stroma targeting of carcinomas. *Int J Cancer.* 92(2):240-248

Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, Ganesan S, Glod JW, Banerjee D (2008)

Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 68(11):4331-4339

Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M (2007)

Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature.* 450(7173):1235-1239

Oliveira LR, Jeffrey SS, Ribeiro-Silva A (2010)

Stem cells in human breast cancer. *Histol Histopathol.* 25(3):371-385. Review

Orian-Rousseau V (2010)

CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur J Cancer.* 46(7):1271-1277. Review

Pachmann K (2005)

Longtime recirculating tumor cells in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 11(15):5657

Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Schneider U, Schünemann S, Höffken K (2005)

Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring. *Breast Cancer Res.* 7(6):R975-979

Paget S (1889)

The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *The Lancet.* 133(3421):571-573

Pantel K, von Knebel Doeberitz M, Izbicki JR, Riethmüller G (1997)

Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies. *Chirurg.* 68(12):1241-1250. Review

Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B (2008)

Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 8(5):329-340

Pappas D, Wang K (2007)

Cellular separations: a review of new challenges in analytical chemistry. *Anal Chim Acta*. 601(1):26-35. Review

Patocs A, Zhang L, Xu Y, Weber F, Caldes T, Mutter GL, Platzer P, Eng C (2007)

Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *N Engl J Med*. 357(25):2543-2551

Pietras K, Östman A. (2010)

Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*. 316(8):1324-1331. Review

Polyak K, Haviv I, Campbell IG (2009)

Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet*. 25(1):30-38. Review

Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB (1999)

Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol*. 277(1 Pt 1):C1-9. Review

Radisky D, Hagios C, Bissell MJ (2001)

Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin Cancer Biol*. 11(2):87-95. Review

Raff MC (1971)

T and B lymphocytes in mice studied by using antisera against surface antigenic markers. *Am J Pathol*. 65(2):467-478. Review

Rege TA, Hagood JS (2006)

Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J*. 20(8):1045-1054

Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ (2003)

The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist*. 8(4):307-325. Review

Rubie C, Kempf K, Hans J, Su T, Tilton B, Georg T, Brittner B, Ludwig B, Schilling M (2005)

Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol Cell Probes*. 19(2):101-109

Saalbach A, Hildebrandt G, Haustein UF, Anderegg U (2002)

The Thy-1/Thy-1 ligand interaction is involved in binding of melanoma cells to activated Thy-1- positive microvascular endothelial cells. *Microvasc Res.* 64(1):86-93

Sangai T, Ishii G, Kodama K, Miyamoto S, Aoyagi Y, Ito T, Magae J, Sasaki H, Nagashima T, Miyazaki M, Ochiai A (2005)

Effect of differences in cancer cells and tumor growth sites on recruiting bone marrow-derived endothelial cells and myofibroblasts in cancer-induced stroma. *Int J Cancer.* 115(6):885-892

Scanlan MJ, Raj BK, Calvo B, Garin-Chesa P, Sanz-Moncasi MP, Healey JH, Old LJ, Rettig WJ (1994)

Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(12):5657-5661

Shaked Y, Henke E, Roodhart JM, Mancuso P, Langenberg MH, Colleoni M, Daenen LG, Man S, Xu P, Emmenegger U, Tang T, Zhu Z, Witte L, Strieter RM, Bertolini F, Voest EE, Benezra R, Kerbel RS (2008)

Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell.* 14(3):263-273

Shimoda M, Mellody KT, Orimo A (2010)

Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol.* 21(1):19-25.

Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, Parker LM, Anderson KS, Harris LN, Garber JE, Richardson AL, Schnitt SJ, Nikolsky Y, Gelman RS, Polyak K (2007)

Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell.* 11(3):259-273

Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL (2002)

Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol.* 20(17):3628-3636

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987)

Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 235(4785):177-182

Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, Gladstone H, Chang HY, Morganroth GS, Oro AE, Brown PO (2006)

Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(40):14842-14847

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973)

A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 51 (5):1409-1416

Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F (2009)

Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One*. 4(4):e4992

Stern DF, Heffernan PA, Weinberg RA (1986)

p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol*. 6(5):1729-1740

Stins MF, Badger J, Sik Kim K (2001)

Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog*. 30(1):19-28

Studený M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M (2002)

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res*. 62(13):3603-3608

Studený M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, Champlin RE, Andreeff M (2004)

Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst*. 96(21):1593-1603

Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R (2006)

Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther*. 5(12):1640-1646

Sund M, Kalluri R (2009)

Tumor stroma derived biomarkers in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 28(1-2):177-83. Review

Taniguchi K, Kajiyama T, Kambara H (2009)

Quantitative analysis of gene expression in a single cell by qPCR. *Nat Methods*. 6(7):503-506

Tanner M, Hollmén M, Junttila TT, Kapanen AI, Tammola S, Soini Y, Helin H, Salo J, Joensuu H, Sihvo E, Elenius K, Isola (2005)

Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol.* 16(2):273-8

Teicher BA, Fricker SP (2010)

CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 16(11):2927-2931

Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S (2009)

Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res Treat.* 115:581-590

Tlsty TD (2001)

Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin Cancer Biol.* 11(2):97-104. Review

Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C (2002)

Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem.* 309(2):293-300

True LD, Zhang H, Ye M, Huang CY, Nelson PS, von Haller PD, Tjoelker LW, Kim JS, Qian WJ, Smith RD, Ellis WJ, Liebeskind ES, Liu AY (2010)

CD90/THY1 is overexpressed in prostate cancer-associated fibroblasts and could serve as a cancer biomarker. *Mod Pathol.* 23(10):1346-1356

Turnovcova K, Ruzickova K, Vanecek V, Sykova E, Jendelova P (2009)

Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media. *Cytotherapy.* 11(7):874-885

Udagawa T, Wood M (2010)

Tumor-stromal cell interactions and opportunities for therapeutic intervention. *Curr Opin Pharmacol.* 10(4):369-374. Review

Wagner K, Kautz A, Röder M, Schwalbe M, Pachmann K, Clement JH, Schnabelrauch M (2004)

Synthesis of oligonucleotide-functionalized magnetic nanoparticles and study on their in vitro cell uptake. *Appl Organomet Chem.* 18:514-519

Weinberg RA (2007)

The Biology of Cancer. New York Abingdon: Garland Science, Taylor & Francis Group, 591

Xouri G, Christian S (2010)

Origin and function of tumor stroma fibroblasts. *Semin Cell Dev Biol.* 21(1):40-46

Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST (2008)

Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell.* 13(2):153-166

Yao ES, Zhang H, Chen YY, Lee B, Chew K, Moore D, Park C (2007)

Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer Res.* 67(2):659-664

Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R (2007)

Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 67:10123–10128

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Erworbene Eigenschaften maligner Zellen.....	5
Abb. 2:	Tumoren als komplexe Gewebe	7
Abb. 3:	Aktivierung von Fibroblasten.....	9
Abb. 4:	Alternative Modelle zu Ursprung und Evolution von Myofibroblasten im Tumorstroma.....	10
Abb. 5:	Invasions-Metastasierungs-Kaskade	13
Abb. 6:	Tumor-Stroma-Interaktionen während der Progression des duktaalen Mammakarzinoms	17
Abb. 7:	Methoden zur Detektion, Anreicherung und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen (CTCs).....	19
Abb. 8:	Separationsprinzip des MOFLO™ High Performance Cell Sorter	23
Abb. 9:	Schematische Darstellung des MACS-Separationsprinzips	24
Abb. 10:	Separationsprinzip des RoboSep® Systems	25
Abb. 11:	Aufbau der Tetrameren Antikörperkomplexe (TACs)	25
Abb. 12:	Schematische Darstellung der (Strept-)Avidin-Biotin Complex (ABC)- Methode	32
Abb. 13:	Präparationsplattform aureka® der Firma aura optik	39
Abb. 14:	AmpliGrid AG480F-PCR-Chip.....	40
Abb. 15:	Ergebnis einer CD45-Separation am Moflo™ High Performance Cell Sorter	47
Abb. 16:	FACS-Analyse der im Rahmen der CD45-Separation am Moflo™ erhaltenen Fraktionen	48
Abb. 17:	Vitalfärbung der im Rahmen der CD45-Separation am Moflo™ erhaltenen Fraktionen	48
Abb. 18:	CD90-Nachweis am Zellkultursystem	50

Abb. 19: Immunhistochemischer CD90-Nachweis an einer Mischpopulation aus Leukozyten und primären humanen Vorhaut-Fibroblasten (Zytospinpräparat)	50
Abb. 20: Zellzahlbestimmung im Anschluss an eine indirekte RoboSep [®] Separation nach CD90	51
Abb. 21: FACS-Analyse der im Zuge einer direkten RoboSep [®] CD90-Separation erhaltenen Fraktionen	52
Abb. 22: Bestimmung der Zellvitalität in der Positivfraktion einer direkten RoboSep [®] Separation nach CD90	52
Abb. 23: Aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten angereicherte CD90-positive Zellen (scan [^] R Galerie)	53
Abb. 24: Etabliertes CD90-Separationsregime und anschließende Analyseverfahren.....	54
Abb. 25: Immunhistochemischer CD90-Nachweis an gepooltem, nach CD90 separiertem Patientenmaterial	55
Abb. 26: Immunhistochemischer Nachweis von Tumor-, Stroma- und Stammzell-spezifischen Markern in den im Zuge der RoboSep [®] Separation nach CD90 erhaltenen Positivfraktionen	56
Abb. 27: Immunfluoreszenz-basierte Doppelfärbung nach CD90 und CD44.....	57
Abb. 28: Expressionshäufigkeit von RPL13A in mRNA-Proben verschiedener Zellkulturzelllinien	60
Abb. 29: Auftrennung und Nachweis der Produkte der qualitativen Einzelzell-PCR.....	60
Abb. 30: Expressionshäufigkeit ausgewählter Tumorzell-, Stroma- und Stammzell-spezifischer Gene in mRNA-Templates verschiedener Zellkulturzellen	61
Abb. 31: Expressionshäufigkeit ausgewählter Stroma- und Stammzell-spezifischer Gene in mRNA-Templates und isolierten Einzelzellen der hTERT-BJ1 Fibroblasten	62
Abb. 32: Expressionshäufigkeit von RPL13A in aus dem peripheren Blut isolierten CD90-positiven und CD90-negativen Zellen	63

Abb. 33: Expressionshäufigkeit ausgewählter Tumorzell-, Stroma- und Stammzell-spezifischer Gene in aus dem peripheren Blut isolierten CD90-positiven und CD90-negativen Zellen.....	63
Abb. 34: Quantitativer Expressionsnachweis von CD90 und FAP- α in der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7	65
Abb. 35: Quantitativer Expressionsnachweis von CD90 und FAP- α in hTERT-BJ1 Fibroblasten	65
Abb. 36: Quantitativer Expressionsnachweis von CD90 und FAP- α in primären Vorhaut-Fibroblasten	66
Abb. 37: Sortierung der Patienten- und Normalblutproben nach der Anzahl CD90-positiver Zellen	68
Abb. 38: Anteil der Patientenproben mit der entsprechenden Anzahl CD90-positiver Zellen	68
Abb. 39: Verteilung der Patientinnen aus den CD90-Verlaufsuntersuchungen auf die einzelnen Kategorien	69
Abb. 40: CD90- und EpCAM-Verlaufsmuster (Patientin #4)	70
Abb. 41: Immunhistochemische Analysen nach CD90 an Paraffin-Gewebeschnitten	71
Abb. 42: Zusammenhang zwischen der Anzahl CD90-positiver Zellen in der Zirkulation und der CD90-Positivität des Gewebes (A) bzw. der Anwesenheit des Primärtumors zu Beginn des Messzeitraums (B)	72
Abb. 43: Zusammenhang zwischen der Anzahl CD90-positiver Zellen in der Zirkulation und dem Metastasierungsstatus	73
Abb. 44: Zusammenhang zwischen der Anzahl CD90-positiver Zellen in der Zirkulation und dem Alter der Patientinnen	74
Abb. 45: Zusammenhang zwischen der Anzahl CD90-positiver Zellen in der Zirkulation und der HER-2/neu-Positivität (A) bzw. der Grading-Stufe des Primärtumors (B)	74
Abb. 46: Zusammenhang zwischen der Anzahl CD90-positiver Zellen in der Zirkulation und der Tumorgroße (A) bzw. dem Nodalstatus (B)	75
Abb. 47: CD90- und EpCAM-Verlaufsuntersuchung (Patientin #5).....	76

Abb. 48: Messfeldausschnitt einer scan ^R -Analyse bezüglich der Koexpression von CD90 und CD31	77
Abb. 49: FACS-Analysen bezüglich der Koexpression von CD90 und CD31 bzw. CD90 und CD34 an Knochenmarkaspirat von Patienten mit hämatologischen Malignitäten.....	78
Abb. 50: scan ^R -Aufnahme einer CD90/CD31 bzw. einer CD90/CD34-koexprimierenden Zelle	78

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Für die RoboSep-Separation verwendete EDTA-Blutproben.....	26
Tab. 2:	Protokoll zur indirekten CD90-FITC RoboSep-Separation	26
Tab. 3:	Protokoll zur Generierung eines Tetrameren CD90-Antikörperkomplexes (CD90 Selection Cocktail).....	27
Tab. 4:	Protokoll zur direkten CD90-TAC RoboSep-Separation	27
Tab. 5:	Protokoll zur direkten CD90-TAC RoboSep-Separation aus Vollblut	28
Tab. 6:	Protokoll zur direkten CD34 RoboSep-Separation	28
Tab. 7:	Protokoll zur Biotin-basierten indirekten CD90 bzw. EpCAM RoboSep- Separation	29
Tab. 8:	Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper und Reaktionsbedingungen I	30
Tab. 9:	Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper und Reaktionsbedingungen II.....	30
Tab. 10:	Protokoll für die durchflusszytometrische Bestimmung CD90/CD31 bzw. CD90/CD34 doppelt positiver Zellen an Patientenmaterial	31
Tab. 11:	Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper I.....	32
Tab. 12:	Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper II	33
Tab. 13:	Für die Immunfluoreszenz-basierte Doppelfärbung verwendete Materialien.....	34
Tab. 14:	Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper III	35
Tab. 15:	Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper und Farbstoffe I	36
Tab. 16:	Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper und Farbstoffe II.....	36
Tab. 17:	Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper und Farbstoffe III.....	37
Tab. 18:	Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper und Farbstoffe IV	37
Tab. 19:	Protokoll für die Mikroskop-basierte Bestimmung CD90/CD31 bzw. CD90/CD34 doppelt positiver Zellen an Patientenmaterial	38

Tab. 20:	Für die thermische Lyse verwendetes Programm.....	40
Tab. 21:	Für die Einzelzell-RT-PCR verwendeter Reaktionsansatz	40
Tab. 22:	Für die Einzelzell-RT-PCR verwendetes Programm	41
Tab. 23:	Für die Silberfärbung verwendetes Protokoll	41
Tab. 24:	Für die Einzelzell-cDNA-Synthese verwendetes Protokoll	42
Tab. 25:	Für die Standard-cDNA-Synthese verwendetes Protokoll	43
Tab. 26:	Einzelzell-qPCR-Reaktionsansatz	43
Tab. 27:	Für die Einzelzell-qPCR verwendetes Programm	43
Tab. 28:	Für die Schmelzkurvenanalyse verwendetes Programm	44
Tab. 29:	Anzahl und Tumorentitäten der in die Verlaufsbeobachtungen einbezogenen Patientinnen	44
Tab. 30:	Für die Bestimmung CD90-positiver Zellen im peripheren Blut verwendetes Protokoll	45
Tab. 31:	Mittels Immunhistochemie untersuchte Marker	55
Tab. 32:	Mittels Einzelzell-RT-PCR untersuchte Gene	58
Tab. 33:	Anzahl und Tumorentitäten der Patientinnen mit mindestens drei generierten Messzeitpunkten	67
Tab. 34:	Kategorien zur Einordnung der Patientinnen aus den CD90- Verlaufsuntersuchungen.....	69
Tab. 35:	Maßstab zur Beurteilung der CD90-Positivität im Gewebe.....	72
Tab. 36:	Für die Blutaufarbeitung verwendete Materialien.....	xxi
Tab. 37:	Verwendete Zelllinien und deren Eigenschaften	xxi
Tab. 38:	Für die Zellkultur verwendete Materialien	xxi
Tab. 39:	Für die Zellzahlbestimmung verwendete Materialien	xxii
Tab. 40:	Für die Zellseparation am Moflo™ verwendete Materialien	xxiii
Tab. 41:	Für die MACS-Separation verwendete Materialien	xxiii
Tab. 42:	Für die Zellseparation verwendete Materialien	xxiv

Tab. 43:	Für die Durchflusszytometrie verwendete Materialien	xxv
Tab. 44:	Für die Fluoreszenzmikroskopie verwendete Materialien.....	xxv
Tab. 45:	Für die Immunhistochemie verwendete Materialien	xxv
Tab. 46:	Für die Immunfluoreszenz verwendete Materialien	xxvii
Tab. 47:	Für die Präparation der Einzelzellen verwendete Materialien.....	xxvii
Tab. 48:	Für die RNA-Isolierung aus Zellkulturzellen verwendete Materialien	xxviii
Tab. 49:	Für die Einzelzell-RT-PCR verwendete Materialien	xxviii
Tab. 50:	Für die Einzelzell-RT-PCR verwendete Primer	xxix
Tab. 51:	Für die Einzelzell-qPCR verwendete Materialien	xxx
Tab. 52:	Für die Einzelzell-qPCR verwendete Primer und Sonden.....	xxx
Tab. 53:	Für die Agarosegelelektrophorese verwendete Materialien	xxxi
Tab. 54:	Für die Bestimmung CD90-positiver Zellen im peripheren Blut verwendete Materialien	xxxi
Tab. 55:	Für die CD90/CD31-Doppelbestimmung verwendetes Patientenmaterial....	xxxiii
Tab. 56:	Für die immunhistochemischen Primärtumoranalysen nach CD90 verwendetes Paraffinmaterial I	xxxiii
Tab. 57:	Für die immunhistochemischen Primärtumoranalysen nach CD90 verwendetes Paraffinmaterial II.....	xxxiv
Tab. 58:	In CD90-Verlaufsbeobachtung einbezogene Mammakarzinompatientinnen	xxxiv
Tab. 59:	In CD90-Verlaufsbeobachtung einbezogene Patientinnen mit verschiedenen anderen Tumoren	xxxvi
Tab. 60:	Für die Blutaufarbeitung verwendete Materialien.....	xxxvii
Tab. 61:	Für die Bestimmung EpCAM-positiver Zellen im peripheren Blut verwendetes Protokoll	xxxvii
Tab. 62:	Für die Bestimmung EpCAM-positiver Zellen im peripheren Blut verwendete Materialien	xxxviii

Tab. 63: Detaillierte Auflistung der Mammakarzinompatientinnen (> 3 Messzeitpunkte).....	xl
Tab. 64: Detaillierte Auflistung der Patientinnen mit Ovarial-, Chorion-, Pankreas- und Zervixkarzinom (> 3 Messzeitpunkte)	xlii

Materialien

Blutauflbereitung

Tab. 36: Für die Blutauflbereitung verwendete Materialien

	<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Erythrozyten-lysepuffer	Ammoniumchlorid [15 mM]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
	Kaliumhydrogencarbonat [10 mM]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
	EDTA-Lösung [500 nM]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
D-PBS-EDTA	D-PBS	Invitrogen™, Eggenstein, BRD
	EDTA [2 mM]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Reagenzröhren konisch (15 ml, 50 ml)		Sarstedt, Nürnbrecht, BRD
Pasteurpipetten (3 ml)		COPAN innovation, Brescia, Italien
Megafuge 2.0 R		Heraeus Instruments, Hanau, BRD

Zellkultur

Tab. 37: Verwendete Zelllinien und deren Eigenschaften

<i>Bezeichnung</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Wachstum</i>	<i>Kultivierung</i>
hTERT-BJ1	humane Vorhaut	adhärent, Monolayer	IMDM, 10 % FCS
primäre Fibroblasten	humane Vorhaut	adhärent, Monolayer	DMEM, 10 % FCS
HBMEC	humanes Hirngewebe	adhärent, Monolayer	RPMI, 10 % FCS
MCF-7	humanes Mammakarzinom	adhärent, Monolayer	DMEM, 10 % FCS
K562	Pleuraerguss (chronische myeloische Leukämie)	in Suspension	RPMI, 10 % FCS

Tab. 38: Für die Zellkultur verwendete Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS	Invitrogen™, Eggenstein, BRD
Trypsin-EDTA	Invitrogen™, Eggenstein, BRD
DMEM (1X) (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen™, Eggenstein, BRD
IMDM (1x) (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	Invitrogen™, Eggenstein, BRD
RPMI 1640 (1X) (Roswell Park Memorial Institute)	Invitrogen™, Eggenstein, BRD
FCS (Fetales Kälberserum)	Biochrom AG, Berlin, BRD

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Isoton [®] II Diluent Beckman Coulter	Beckman Coulter, Krefeld, BRD
Uvasol [®] Aceton für Spektroskopie	Merck, Darmstadt, BRD
Zellkulturflaschen Cellstar [®] (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, BRD
SuperFrost Objektträger	MENZEL-GLÄSER, Braunschweig, BRD
Polysine [™] Objektträger	MENZEL-GLÄSER, Braunschweig, BRD
Culture Slides (8 chambers)	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, BRD
Zyto-Winkelkammer mit Dichtung PP 1-fach dm 6,3/30 mm ²	Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen, BRD
Filter-Karten passend für Zyto-Winkelkammer	Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen, BRD
Axiovert 25 mit AxioCAM HRC	ZEISS, Jena, BRD
AxioVision 3.1	ZEISS, Jena, BRD
Sterilwerkbank HERAsafe [®] HS 12/2	Heraeus Instruments, Hanau, BRD
STERI-CULT 200 Inkubator	Forma Scientific Inc, International, USA
Coulter [®] Z2 particle count & size analyzer	Beckman Coulter, Krefeld, BRD
Zentrifuge Rotofix 32	Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen, BRD

Zellzahlbestimmung

Tab. 39: Für die Zellzahlbestimmung verwendete Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Isoton [®] II Diluent Beckman Coulter	Beckman Coulter, Krefeld, BRD
D-PBS	Invitrogen [™] , Eggenstein, BRD
Messgefäße	Beckman Coulter, Krefeld, BRD
Coulter [®] Z2 particle count & size analyzer	Beckman Coulter, Krefeld, BRD
Axiovert 25 mit AxioCAM HRC	ZEISS, Jena, BRD
Neubauer Zählkammer mit Deckglas (Tiefe: 0,1 mm; 0,0025mm ²)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, BRD

MOFLO™ High Performance Cell Sorter

Tab. 40: Für die Zellseparation am Moflo™ verwendete Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Human CD45/Mouse Monoclonal Antibody Phycoerythrin (PE)-conjugated	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD
Anti-Human EpCAM/Mouse Monoclonal Antibody Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-conjugated	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD
D-PBS-EDTA [2 mM]	siehe Materialien Blutauarbeitung (Tab. 36)
Röhrchen (5 ml, 75 x 12 mm, PP)	Sarstedt, Nürnberg, BRD
S1312 MOFLO™ High Performance Cell Sorter	Cytomation Inc., Fort Collins, CO, USA
Summit™ V3.0 for Moflo® Acquisition and Sort Control	Cytomation Inc., Fort Collins, CO, USA

MACS®

Tab. 41: Für die MACS-Separation verwendete Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS-EDTA [2 mM]	siehe Materialien Blutauarbeitung (Tab. 36)
Carboxymethyldextran umhüllte Magnetnanopartikel	präpariert wie 2004 von Wagner und Kollegen beschrieben (Wagner et al., 2004)
MACS® Separation Columns (MS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD
MACS® Separation Columns (LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD
Röhrchen (5 ml, 75 x 12 mm, PP)	Sarstedt, Nürnberg, BRD
SuperMACS™ II Separation Unit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, BRD

RoboSep[®]

Tab. 42: Für die Zellseparation verwendete Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS	Invitrogen [™] , Eggenstein, BRD
RoboSep [®] Buffer	StemCell Technologies, Köln, BRD
RBC Lysis Buffer (10x)	StemCell Technologies, Köln, BRD
Anti-Human CD32 (Fcγ RII) Blocker	StemCell Technologies, Köln, BRD
RoboSep [®] Human CD34 Selection Kit	StemCell Technologies, Köln, BRD
RoboSep [®] Human EpCAM Positive Selection Kit	StemCell Technologies, Köln, BRD
RoboSep [®] FITC Selection Kit	StemCell Technologies, Köln, BRD
RoboSep [®] Biotin Selection Kit	StemCell Technologies, Köln, BRD
RoboSep [®] Human "Do-It-Yourself" Selection Kit	StemCell Technologies, Köln, BRD
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody-unconjugated [200 µg/ml]	Dianova, Hamburg, BRD
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody FITC-conjugated [200 µg/ml]	Dianova, Hamburg, BRD
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody Biotin-conjugated [0,5 mg/ml]	BioLegend GmbH, Fell, BRD
Anti-Human VEGFR-1/Flt-1/Mouse Monoclonal Antibody Biotin-conjugated [50 µg/ml]	Acris Antibodies GmbH, Herford, BRD
Anti-Human EpCAM/Mouse Monoclonal Antibody Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-conjugated	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD
Anti-Human EpCAM/Mouse Monoclonal Antibody Biotin-conjugated [0,2 mg/ml]	Abcam, Cambridge, UK
RoboSep [®] Tip Racks	StemCell Technologies, Köln, BRD
FALCON 14 ml Polystyrene Round-Bottom-Tube (17x100 mm)	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, BRD
RoboSep [®] The fully automated cell separator	StemCell Technologies, Köln, BRD

FACS

Tab. 43: Für die Durchflusszytometrie verwendete Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
FACS Flow [™] , FACS Clean, FACS Rinse	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, BRD
D-PBS	Invitrogen [™] , Eggenstein, BRD
D-PBS-EDTA [2 mM]	siehe Materialien Blutaufarbeitung (Tab. 36)
Röhrchen (5 ml, 75 x 12 mm, PP)	Sarstedt, Nümbrecht, BRD
FACS Calibur	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, BRD

Fluoreszenzmikroskopie

Tab. 44: Für die Fluoreszenzmikroskopie verwendete Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS	Invitrogen [™] , Eggenstein, BRD
D-PBS-EDTA [2 mM]	siehe Materialien Blutaufarbeitung (Tab. 36)
bisBENZIMIDE 100 mg (Hoechst No. 33342)	Sigma-Aldrich Co.
Polysine [™] Objektträger und Deckgläser	MENZEL-GLÄSER, Braunschweig, BRD
LSC [™] , Mikroskop OLYMPUS BX50	Cytomation Inc., Fort Collins, CO, USA
Axioplan2 imaging, HBO 50, AxioCAM HRC	ZEISS, Jena, BRD

Immunhistochemie

Tab. 45: Für die Immunhistochemie verwendete Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Tris-Puffer (TBS) mit Tween 20 (TBS-Tween)	Trizma [®] base [7,4 mM] Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD Trizma [®] hydrochloride [43,46 mM] Natriumchlorid [150,24 mM] Carl Roth [®] , Karlsruhe, BRD Tween [®] 20 [0,001 %] Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Uvasol [®] Aceton für Spektroskopie	Merck, Darmstadt, BRD
Formalin	Overlack Chemische Produkte, Leipzig, BRD
Ethanol [96 %]	J.T. Baker, Griesheim, BRD
Xylol	VWR International GmbH, Dresden, BRD

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Paraffin	Merck, Darmstadt, BRD
Dako Cytomation Target Retrieval Solution pH 9 (10x)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, BRD
Dako Biotin Blocking System	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, BRD
Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/Red, Rabbit/Mouse	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, BRD
Dako Antibody Diluent	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, BRD
Mayer's Hematoxylin Solution	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Glycerol-Gelatine für Mikroskopie	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, BRD
Gewebe-Einbettkassetten	KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, BRD
SuperFrost Objektträger	MENZEL-GLÄSER, Braunschweig, BRD
Deckgläser	MENZEL-GLÄSER, Braunschweig, BRD
Microtom HM340E	Microm International GmbH, Walldorf, BRD
Thermo Shandon Pathcentre Tissue Processor	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, BRD
Schüttelwasserbad GFL®	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, BRD
Axiovert 25 mit AxioCAM HRC (10 x 10 bzw. 10 x 40), AxioVision 3.1	ZEISS, Jena, BRD
Mikroskop Axioskop 2 MOT, HAL100, AxioVision Rel. 4.6	ZEISS, Jena, BRD

Immunfluoreszenz

Tab. 46: Für die Immunfluoreszenz verwendete Materialien

Materialien	Hersteller
D-PBS-EDTA [2 mM]	siehe (Tab. 36)
Accustain Formalin solution, 10 % neutral gepuffert	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Albumin from bovine serum [minimum 98 %]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Imaging Plate CG (96 well)	zell-kontakt GmbH, Nörten-Hardenberg, BRD
scan ^R Screening Station for Life Science	Olympus, Hamburg, BRD
scan ^R Analysis 1.06 beta (for scan ^R 2.01)	Olympus, Hamburg, BRD

Einzelzell-RT-PCR

Tab. 47: Für die Präparation der Einzelzellen verwendete Materialien

Materialien	Hersteller
RoboSep [®] Buffer	StemCell Technologies, Köln, BRD
Albumin from bovine serum (minimum 98%)	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa [®])	Fresenius Kabi BRD, Bad Homburg v. d .H., BRD
Alexa Fluor [®] 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) conjugate	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD
7-Aminoactinomycin D (7-AAD) [20 µg/ml]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Pinzette N5 (11262-30) Dumont #N5 Forceps-Dumoxel	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, BRD
Glass-beads PGB-20, 100-200 µ	G. Kisker GbR, Steinfurt, BRD
Glaskapillaren (Ø 25µm)	Hilgenberg GmbH, Malsfeld, BRD
AmpliGrid AG480F	Beckman Coulter, Krefeld, BRD (ehemals Advantix)
Fluoreszenzmikroskop SteREO Lumar , Axionplan 2 imaging	ZEISS, Jena, BRD
Neolumar S 1,5x (Objektiv, Auflösung 0,6 µm)	ZEISS, Jena, BRD
System Control Panel SYCOP mit EMS-2	ZEISS, Jena, BRD
FluoArc HBO 100	ZEISS, Jena, BRD

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena, BRD

Materialien	Hersteller
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, BRD
RNase OUT™-Ribonuklease [40 U/μl]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD
Sealing Solution	Beckman Coulter, Krefeld, BRD (ehemals Advalytix)
10 x TBE	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD
Ladungspuffer Bromphenolblau [0,25 %]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Sucrose [40 %]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Criterion™ Precast Gel 10 %TBE-Urea, 1.0 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, BRD
1kb DNA-ladder	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD
Low molecular weight marker	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, BRD
SilverXpress® Silver Staining Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD
Reinstwasser (Milli-Q)	Millipore Corporation, Schwalbach/TS., BRD

AmpliSpeed Slide Cycler (ASC200D)	Beckman Coulter, Krefeld, BRD (ehemals Advantix)
Gelelektrophorese-Kammer Criterion™ Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, BRD
Stromquelle PowerPac200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, BRD
Schüttler HS501	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, BRD

xxviii

Endkonzentration von 20 μ M gelöst und einzeln bzw. in verschiedenen Kombinationen von bis zu sieben Primern verwendet.

Tab. 50: Für die Einzelzell-RT-PCR verwendete Primer

<i>Primername</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Produktgröße</i>
α -SMA	forward CCA GCA CCA TGA AGA TCA AG reverse CGG CTT CAT CGT ATT CCT GT	132 bp
CD90	forward CCC AGT GAA GAT GCA GGT TT reverse GAC AGC CTG AGA GGG TCT TG	184 bp
EpCAM	forward CTG GCC GTA AAC TGC TTT GT reverse ACG CGT TGT GAT CTC CTT CT	420 bp
FAP- α	forward GCT GGG AAT ATT ACG CGT CT reverse GCA AAC TGT CTG AGG GGT TT	395 bp
Gremlin	forward AAC TTG GCC TAC TGG CAA TG reverse TCT CGA GTT GCA AGG GTT CT	264 bp
HER-2	forward CGA GAG GTG AGG GCA GTT AC reverse AGC AGA GGT GGG TGT TAT GG	376 bp
RPL13A	forward AGC TCA TGA GGC TAC GGA AA reverse CTT GCT CCC AGC TTC CTA TG	229 bp
SCF	forward GAG AGG GGA GAT GTG TCC TG reverse CAA GCA GCT AGC ATC CAA AA	142 bp
SDF-1	forward CCA AAC TGT GCC CTT CAG AT reverse AGG TAC AGG GCA TGG ATG AA	346 bp
VEGFR-1	forward GGC ACA GAG ACC CAA AAG AA reverse GAG GTG GCA TTC GGT AAA AG	301 bp
Vimentin	forward GGC TCA GAT TCA GGA ACA GC reverse GCT TCA ACG GCA AAG TTC TC	327 bp

Einzelzell-qPCR

Tab. 51: Für die Einzelzell-qPCR verwendete Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
FastLane Cell cDNA Kit	Qiagen, Hilden, BRD
Rotor-Gene Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden, BRD
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml	Qiagen, Hilden, BRD
PCR-Gefäße, 0,2 ml	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, BRD
Rotor-Gene Q	Qiagen, Hilden, BRD

Die verwendeten Primer (siehe Tab. 52) wurden von der Firma Jena Bioscience (Jena, BRD) synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 20 μ M gelöst.

Tab. 52: Für die Einzelzell-qPCR verwendete Primer und Sonden

<i>Primer-,Sondenname</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Produktgröße</i>
CD90_qPCR_1_F	forward CCC AGT GAA GAT GCA GGT TT	184 bp
CD90_PCR_1_R	reverse GAC AGC CTG AGA GGG TCT TG	
CD90_PCR_1_MGB	FAM-TAA GGA AGC TAA AAG CAT GG-BHQ-1	
FAP_qPCR_4_F	forward GGT CTC CCA ACA AAG GAT GA	186 bp
FAP_qPCR_4_R	reverse CAT TGC CTG GAA ATC CAC TT	
FAP_qPCR_4_MGB	FAM-GCA CAG ATT GCT AAA GCT CT-BHQ-1	
GUS_qPCR_1_F	forward AGA AAC GAT TGC AGG GTT TCA C	205 bp
GUS_qPCR_1_R	reverse CCG AGT GAA GAT CCC CTT TTT A	
GUS_qPCR_1_MGB	FAM-TGA ACA GTC ACC GAC GAG AG-BHQ-1	

Ein Teil der PCR-Produkte wurde im Anschluss an die qPCR mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

Tab. 53: Für die Agarosegelelektrophorese verwendete Materialien

<i>Materialien</i>			<i>Hersteller</i>
DNA-Ladungspuffer	Tris-HCl	10 mM pH 8,0	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
	Na ₂ -EDTA	1 mM	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
	SDS	15 mM	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
	Glycerin	0,1 %	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
	Bromphenolblau	30 %	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
TAE-Laufpuffer [1x]	Tris-Acetat	40 mM	Carl Roth [®] , Karlsruhe, BRD
	Na ₂ -EDTA	1 mM, pH 8,5	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Agarose (Elektrophoresis Grade)			Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD
Ethidiumbromid (10 mg/ml)			Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD
1kb DNA-ladder			Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD
Agagel Maxi/Mini			Biometra GmbH, Göttingen, BRD
Stromquelle Mighty Slim™			Hoefer, Inc., Holliston, MA, USA
Gel Jet Imager			Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, BRD

Verlaufsbeobachtungen CD90-positiver Zellen

Tab. 54: Für die Bestimmung CD90-positiver Zellen im peripheren Blut verwendete Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS-EDTA [2 mM]	siehe (Tab. 36)
Accustain Formalin solution, 10 % neutral gepuffert	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Albumin from bovine serum (minimum 98 %)	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Anti-Human CD90 (Thy-1)/Mouse Monoclonal Antibody-unconjugated	Dianova, Hamburg, BRD
Alexa Fluor [®] 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) conjugate	Invitrogen GmbH, Darmstadt, BRD
7-Aminoactinomycin D (7-AAD) [20 µg/ml]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Imaging Plate CG (96 well)	zell-kontakt GmbH, Nörten-Hardenberg, BRD
scan [^] R Screening Station for Life Science	Olympus, Hamburg, BRD
scan [^] R Analysis 1.06 beta (for scan [^] R2.01)	Olympus, Hamburg, BRD

Anhang

Anlagenverzeichnis

A-1	Auflistung verwendeter Patientenmaterialien	xxxiii
A-2	Protokoll zur Quantifizierung zirkulierender EpCAM-positiver Zellen	xxxvii
A-3	TNM Staging System und Eingruppierung des Mammakarzinoms	xxxix
A-4	Klassifizierung der in die CD90-Verlaufsbeobachtungen bzw. Primärtumoranalysen eingegangenen Patientinnen	xl
A-5	Lebenslauf	xliii
A-6	Kongressbeiträge	xliv
A-7	Ehrenwörtliche Erklärung	xlvi
A-8	Danksagung	xlvi

A-1 Patientenmaterial

Tab. 55: Für die CD90/CD31-Doppelbestimmung verwendetes Patientenmaterial

<i>Material</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Fälle</i>
peripheres Blut	Patientinnen mit gynäkologischen Tumoren	4 Mammakarzinome 1 Ovarialkarzinom
	Patientinnen mit hämatologischen Malignitäten	1 Non-Hodgkin-Lymphom 1 ALL (84 % CD34 ⁺ Zellen)
Knochenmark-aspirat	Patientinnen mit gynäkologischen Tumoren	1 Ovarialkarzinom
	Patientinnen mit hämatologischen Malignitäten	1 ALL (~84 % CD34 ⁺ Zellen) 2 AML (~3 % bzw. ~12 % CD34 ⁺ Zellen)
		1 Kutane Mastozytose

Tab. 56: Für die immunhistochemischen Primärtumoranalysen nach CD90 verwendetes Paraffinmaterial I

<i>Präparat</i>	<i>Patientin #</i>	<i>Charakteristik Mammakarzinom</i>	<i>Klassifikation</i>	<i>chirurgische Interventionen</i>	
				<i>Mastektomie</i>	<i>Brusterhaltende Therapie</i>
17692/07	9	invasiv duktal und lobulär	G3		10/2007
19144/05	10	invasiv duktal	G3	10/2005 (partiell)	09/2005
20534/08	16	invasiv duktal	G2		11/2008
19976/08	17	invasiv duktal (Stanze)	U		09/2009
6125/09	20	invasiv duktal	G2	04/2009	
8524/08	23	invasiv mikropapillär (rechts)	G2	05/2008	
8525/08	23	invasiv duktal (links)	G3	05/2008	
12058/09	56	invasiv duktal	G3	07/2009 rechts	08/2001 links 06/2002 rechts
19205/08	64	kribiform duktal	G1		10/2008

Tab. 57: Für die immunhistochemischen Primärtumoranalysen nach CD90 verwendetes Paraffinmaterial II

<i>Präparat</i>	<i>Patientin #</i>	<i>Charakteristik</i>	<i>Klassifi- kation</i>	<i>chirurgische Interventionen</i>	
8800/08	30	Milz-Metastasen eines serösen Zystadenokarzinoms	G3	11/2005 05/2008	Uterusexstirpation Tumordebulking, Splenektomie

Tab. 58: In CD90-Verlaufsbeobachtung einbezogene Mammakarzinompatientinnen
(nähere Informationen zur TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms sind im Anhang A-3 aufgeführt)

#	<i>Charakteristik</i>	<i>Erstdiagnose</i>	<i>pTNM-Klassifikation</i>		
		<i>Monat/Jahr</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>
1	Schweißdrüsenkarzinom (Mamma)	06/1993	1	0	1
2	invasiv duktal (rechts)	09/2006	4	1	1
4	intraduktal, Anteile invasiv-duktral und invasiv lobulär, DCIS (links)	12/1999	1	1	1
5	invasiv duktal (rechts)	05/2004	1	x	1
8	invasiv duktal (rechts)	11/1998	1	0	1
	invasiv lobulär (links)	02/2005	1	0	1
9	invasiv duktal und lobulär (rechts)	09/2007	1	0	0
10	invasiv duktal (rechts)	02/2005	1	1	1
11	invasiv duktal (links)	11/2008	2	1	0
13	invasiv duktal (links)	10/2008	2	3	1
14	invasiv lobulär (links)	01/2009	2	0	0
16	invasiv duktal (rechts)	10/2008	2	3	0
17	invasiv duktal (rechts)	10/2008	1	1	1
18	intraduktales, papilläres, invasives Adenokarzinom (links)	02/2009	1	2	0
20	invasiv duktal (links)	03/2009	2	2	0
21	invasiv duktal (links)	02/2008	1	3	0
23	invasiv mikropapillär (rechts)	04/2008	1	1	0
	invasiv duktal (links)	04/2008	1	0	0
26	invasiv duktal (rechts)	11/2008	1	0	0

#	Charakteristik	Erstdiagnose	pTNM-Klassifikation		
		Monat/Jahr	T	N	M
28	invasiv duktal (rechts)	07/2008	1	0	0
31	invasiv duktal (links)	06/2009	x	x	0
35	invasiv duktal, nicht infiltrierend (rechts)	03/2009	1	0	0
36	invasiv duktal (rechts)	06/2009	1	0	0
37	lobulär (links)	06/2009	1	0	0
45	lobulär (rechts)	11/2008	2	0	0
47	invasiv duktal (links)	02/1992	1	0	0
	invasiv duktal (rechts)	06/2009	2	0	0
49	invasiv duktal (rechts)	04/2009	2	0	0
51	invasiv duktal (rechts) exulzerierend	08/2009	4	2	1
53	invasiv duktal (links)	07/2007	3	2	1
54	invasiv duktal (links)	06/2009	2	0	0
55	invasiv duktal (rechts)	05/2009	1	1	0
56	invasiv duktal (links)	08/2001	1	0	0
	invasiv duktal (rechts)	06/2002	1	0	0
60	invasiv lobulär (rechts)	01/2009	1	0	0
61	invasiv lobulär (rechts)	08/2009	2	0	0
	invasiv duktal (links)	08/2009	1	0	0
62	invasiv duktal (multizentrisch, links)	08/2009	2	0	0
63	invasiv duktal und lobulär (links)	02/2008	1	0	0
64	kribiform duktal (links)	09/2008	1	0	0
66	invasiv duktal (rechts)	06/2009	1	0	1
67	invasiv duktal (rechts)	06/2009	1	0	0
68	invasiv duktal (links)	10/2009	1	1	0
70	invasiv duktal (links)	09/2009	2	3	0
72	lobulär (rechts)	03/2009	1	0	0

Tab. 59: In CD90-Verlaufsbeobachtung einbezogene Patientinnen mit verschiedenen anderen Tumoren

#	<i>Charakteristik</i>	<i>Erstdiagnose</i> <i>Monat/Jahr</i>	<i>pTNM-Klassifikation</i>		
			<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>
30	seröses Zystadenokarzinom des Ovars	11/2005	3	0	1
33	Chorionkarzinom, metastasiert	05/2009	x	x	1
46	Siegelringkarzinom des Ovars	06/2009	3	0	0
52	serös papilläres Adenokarzinom des Ovars	01/2008	3	1	0
69	duktales Adenokarzinom des Pankreas	09/2007	2	1	1
	muzinöses Karzinom des Ovars	11/2008	x	x	x
71	nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom der Zervix	11/2009	2	1	0

A-2 Protokoll zur Quantifizierung zirkulierender EpCAM-positiver Zellen (nach PD Dr. Katharina Pachmann, Universitätsklinikum Jena)

Von dem mit EDTA als Antikoagulant versetzten peripheren Blut wurde 1 ml unter Zugabe von 9 ml Erythrozytenlysepuffer 10 min bei Raumtemperatur lysiert und anschließend 10 min bei $300 \times g$ sedimentiert. Das resultierende Leukozytenpellet wurde in 500 μ l D-PBS-EDTA resuspendiert (verwendete Materialien siehe Tab. 60).

Tab. 60: Für die Blutaufarbeitung verwendete Materialien

	<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Erythrozyten-lysepuffer	Ammoniumchlorid [15 mM]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
	Kaliumhydrogencarbonat [10 mM]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
	EDTA-Lösung [500 nM]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
D-PBS-EDTA	D-PBS	Invitrogen™, Eggenstein, BRD
	EDTA [2 mM]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Reagenzröhrchen konisch (15 ml, 50 ml)		Sarstedt, Nümbrecht, BRD
Pasteurpipetten (3 ml)		COPAN innovation, Brescia, Italien
Megafuge 2.0 R		Heraeus Instruments, Hanau, BRD

Von der so erhaltenen Leukozytenzellsuspension wurden anschließend 50 μ l nach dem in Tab. 61 aufgeführten Protokoll gefärbt.

Tab. 61: Für die Bestimmung EpCAM-positiver Zellen im peripheren Blut verwendetes Protokoll

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Inkubationsdauer</i>
EpCAM-Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD	1:10	
7-Aminoactinomycin D (7-AAD) [10 μ g/ml]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD	1:10	30 min RT
Albumin from bovine serum (minimum 98 %) [10 %]	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD	1:10	

Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde die Zellsuspension mit 435 μ l D-PBS-EDTA auf ein Volumen von 500 μ l aufgefüllt. Für die Fluoreszenzdetektion wurden dann 20 μ l des Ansatzes zusammen mit 150 μ l D-PBS-EDTA:Formalin (1:1) in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben, wo die Zellen für 45 min sedimentierten (verwendete Materialien siehe Tab. 62). Im Rahmen der Messung wurde schließlich die Hälfte der Wellfläche in

Form von 100 Messfeldern photographisch dokumentiert. Quantifiziert wurden im Anschluss vitale (7-AAD-negative) EpCAM-positive Zellen aus zwei parallel durchgeführten Messungen. Die Angabe der Anzahl EpCAM-positiver Zellen erfolgte auf 1 ml Ausgangsmaterial nach vorheriger Mittelwertberechnung.

Tab. 62: Für die Bestimmung EpCAM-positiver Zellen im peripheren Blut verwendete Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS-EDTA [2 mM]	siehe (Tab. 36)
Accustain Formalin solution, 10 % neutral gepuffert	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, BRD
Imaging Plate CG (96 well)	zell-kontakt GmbH, Nörten-Hardenberg, BRD
scan [^] R Screening Station for Life Science	Olympus, Hamburg, BRD
scan [^] R Analysis 1.06 beta (for scan [^] R2.01)	Olympus, Hamburg, BRD

A-3 TNM Staging System und Eingruppierung des Mammakarzinoms

modifiziert nach Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL (2002)

Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol.* 20(17):3628-36

Primärtumor (T)

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Karzinom in situ
T1	Tumor ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor $> 2,0$ cm, aber nicht $> 5,0$ cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor $> 5,0$ cm in größter Ausdehnung
T4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf die Brustwand oder die Haut

Regionäre Lymphknoten (N)

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (z.B. bereits entfernt)
N0	histologisch keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in einem bis drei axillären Lymphknoten
N2	Metastasen in vier bis neun axillären Lymphknoten

Fernmetastasen (M)

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

A-4 Klassifizierung der in die CD90-Verlaufsbeobachtungen bzw. Primärtumoranalysen eingegangenen Patientinnen

Tab. 63: Detaillierte Auflistung der Mammakarzinompatientinnen (> 3 Messzeitpunkte)

Patientin		Charakteristik		Tumorklassifikation					diagnostizierte		CD90-Verlaufsbeobachtung				zugeordnete	
#	Alters- gruppe	Mammakarzinom		(pathologisch)					Metastasen		Mess- zeitraum	Anzahl Proben	Anteil Proben mit CD90-positiven Zellen		CD90 Kategorie	
		Histologie	Zeitpunkt Diagnose	Grading- Stufe	T	N	M	HER-2/neu Positivität	Ort	Zeit- punkt			> 1000/ml	Maximum	Peri- pherie	Gewebe
1	>60	Schweißdrüsenkarzinom (Mamma, rechts)	06/1993	2	1	0	1	unbekannt	Becken Skelett Skelett	05/1996 09/2004 04/2007	07/09-02/10	5	0%	987	0	
2	>60	invasiv duktal (rechts)	09/2006	3	4	1	1	negativ	Knochen	04/2007	08-09-12/09	3	0%	0	0	
4	>60	intraduktal, Anteile invasiv-duktral und invasiv lobulär (links)	12/1999	3	1	1	1	schwach	Knochen Leber	12/2001 12/2001	01/09-10/09	10	40%	35.930	2	
5	40-60	invasiv duktal (rechts)	05/2004	3	1	x	1	stark	Lunge, Lymph- knoten, Knochen	06/2007 07/2010	02/09-06/10	11	45%	20.531	2	
8	40-60	invasiv duktal (rechts) invasiv lobulär (links)	11/1998 02/2005	3 3	1 1	0 0	1 1	unbekannt schwach	Skelett, Haut Leber	11/2007 04/2008	03/09-07/09	4	0%	197	0	
9	40-60	invasiv duktal und lobulär (rechts)	09/2007	3	1	0	0	stark			03/09-10/09	8	25%	6.515	2	1
10	40-60	invasiv duktal (rechts)	02/2005	3	1	1	1	mäßig-stark	Leber Lunge, Knochen Lymphknoten	03/2007 01/2008 01/2008	03/09-02/11	21	43%	22.308	2	0
11	<40	invasiv duktal (links), neoadjuvant	11/2008	2	2	1	0	mäßig			03/09-06/09	4	50%	54.000	2	
13	>60	invasiv duktal (links)	10/2008	3	2	3	1	stark	Hirn Leber	12/2009 02/2010	04/09-09/09	8	0%	395	0	
14	>60	invasiv lobulär (links)	01/2009	3	2	0	0	stark			04/09-11/09	10	50%	7.502	2	
16	40-60	invasiv duktal (rechts)	10/2008	2	2	3	0	stark	V.a. Lunge	10/2008	04/09-01/10	7	14%	1.184	0	0
17	40-60	invasiv duktal metastasiert (rechts)	10/2008	U	1	1	1	mäßig	Knochen, Leber	10/2008	04/09-01/10	6	17%	1.382	0	2
18	40-60	intraduktales, papilläres Adenokarzinom mit Invasion (links)	02/2009	2	1	2	0	mäßig			05/09-07/10	3	0%	592	0	
20	40-60	invasiv duktal (links)	03/2009	2	2	2	0	schwach-mäßig			05/09-05/10	8	0%	0	0	1

Patientin		Charakteristik		Tumorklassifikation					diagnostizierte		CD90-Verlaufsbeobachtung				zugeordnete	
		Mammakarzinom		(pathologisch)					Metastasen				Anteil Proben mit		CD90 Kategorie	
#	Alters- gruppe	Histologie	Zeitpunkt Diagnose	Grading- Stufe	T	N	M	HER-2/neu Positivität	Ort	Zeit- punkt	Mess- zeitraum	Anzahl Proben	CD90-positiven Zellen > 1000/ml	Maximum	Peri- pherie	Gewebe
21	>60	invasiv duktal (links)	02/2008	2	1	3	0	stark			05/09-05/10	3	33%	1.382	0	
23	>60	invasiv mikropapillär (rechts)	04/2008	3	1	1	0	stark			06/09-01/10	9	33%	12.240	2	2
		invasiv duktal (links)	04/2008	3	1	0	0	stark								1
26	40-60	invasiv duktal (rechts)	11/2008	3	1	0	0	stark			06/09-09/09	6	50%	3.553	1	
28	>60	invasiv duktal (rechts)	07/2008	2	1	0	0	stark			06/09-02/10	6	17%	1.777	0	
31	40-60	invasiv duktal (links), neoadjuvant	06/2009	2	x	x	0	negativ			07/09-12/09	7	0%	197	0	
35	<40	invasiv duktal (rechts), nicht infiltrierend intraduktal	03/2009	2	1	0	0	schwach-mäßig			07/09-09/09	3	0%	0-197	0	
36	40-60	invasiv duktal (rechts), neoadjuvant	06/2009	2	1	0	0	stark			07/09-12/09	7	0%	197	0	
37	40-60	lobulär (links)	06/2009	2	1	0	0	negativ			07/09-11/09	6	0%	395	0	
45	40-60	lobulär (rechts)	11/2008	2	2	0	0	mäßig			08/09-09/09	3	0%	592	0	
47	>60	invasiv duktal (links)	02/1992	3	1	0	0	unbekannt			08/09-12/09	6	50%	4.343	1	
		invasiv duktal (rechts)	06/2009	3	2	0	0	negativ								
49	40-60	invasiv duktal (rechts)	04/2009	2	2	0	0	negativ			08/09-10/09	3	66%	1.382	1	
51	>60	invasiv duktal (rechts) exulzerierend	08/2009	2	4	2	1	negativ-schwach	Knochen, Lunge Leber, Milz	08/2009 01/2010	09/09-02/10	9	0%	395	0	
53	<40	invasiv duktal (links)	07/2007	3	3	2	1	stark	Pleura Lunge	05/2909 10/2009	09/09-01/10	5	0%	395	0	
54	>60	invasiv duktal (links)	06/2009	3	2	0	0	negativ-schwach			09/09-12/09	5	60%	7.107	2	
55	40-60	invasiv duktal (rechts)	05/2009	2	1	1	0	schwach			09/09-11/09	3	0%	395	0	
56	40-60	invasiv duktal (links)	08/2001	3	1	0	0	unbekannt			09/09-12/09	4	0%	987	0	1
		invasiv duktal (rechts)	06/2002	3	1	0	0	negativ								
60	<40	invasiv lobulär (rechts)	01/2009	2	1	0	0	stark			10/09-02/10	3	0%	790	0	
61	>60	invasiv lobulär (rechts)	08/2009	2-3	2	0	0	negativ			10/09-02/10	6	0%	592	0	
		invasiv duktal (links)	08/2009		1	0	x	negativ								
62	>60	invasiv duktal (multizentrisch, links), neoadjuvant	08/2009	3	2	0	0	stark			10/09-02/10	7	0%	395	0	

Patientin		Charakteristik		Tumorklassifikation					diagnostizierte		CD90-Verlaufsbeobachtung				zugeordnete	
		Mammakarzinom		(pathologisch)					Metastasen				Anteil Proben mit		CD90 Kategorie	
#	Alters- gruppe	Histologie	Zeitpunkt Diagnose	Grading- Stufe	T	N	M	HER-2/neu Positivität	Ort	Zeit- punkt	Mess- zeitraum	Anzahl Proben	CD90-positiven Zellen > 1000/ml	Maximum	Peri- pherie	Gewebe
63	>60	invasiv duktal und lobulär (links)	02/2008	3	1	0	0	negativ			10/09-01/10	3	0%	197	0	
64	40-60	kribriform duktal (links)	09/2008	2	1	0	0	mäßig			11/09-03/10	6	50%	1.777	1	1
66	40-60	invasiv duktal (rechts)	06/2009	2	1	0	1	schwach	Lunge, V.a. Knochen	06/2010	11/09-01/10	4	0%	987	0	
67	40-60	invasiv duktal (rechts)	06/2009	3	1	0	0	negativ			11/09-03/10	3	50%	4.935	1	
68	<40	invasiv duktal (links)	10/2009	2	1	1	0	schwach			11/09-03/10	6	0%	790	0	
70	<40	invasiv duktal (links)	09/2009	3	2	3	0	stark			12/09-02/10	5	0%	197	0	
72	40-60	lobulär (rechts)	03/2009	2	1	0	0	mäßig			11/09-03/10	3	0%	0	0	

Tab. 64: Detaillierte Auflistung der Patientinnen mit Ovarial-, Chorion-, Pankreas- und Zervixkarzinom (> 3 Messzeitpunkte)

Patientin		Charakteristik		Tumorklassifikation					diagnostizierte		CD90-Verlaufsbeobachtung				zugeordnete	
		Mammakarzinom		(pathologisch)					Metastasen				Anteil Proben mit		CD90 Kategorie	
#	Alters- gruppe	Histologie	Zeitpunkt Diagnose	Grading- Stufe	T	N	M	HER-2/neu Positivität	Ort	Zeit- punkt	Mess- zeitraum	Anzahl Proben	CD90-positiven Zellen > 1000/ml	Maximum	Peri- pherie	Gewebe
30	40-60	Ovarial-Ca. seröses Zystadenokarzinom	11/2005	3	3	0	1	unbekannt	Leber Milz	03/2007 04/2008	07/09-10/09	4	0%	0	0	2
33	<40	Chorion-Ca., neoadjuvant Plazenta, foetale Membranen	05/2009	U	unbekannt		1	unbekannt	Lunge Knochen	05/2009 06/2009	07/09-10/09	3	67%	5922	2	
46	40-60	Ovarial-Ca. Siegelringzellkarzinom	06/2009	U	3	0	0	unbekannt			08/09-12/09	4	0%	197	0	
52	40-60	Ovar (beidseits) serös papilläres Adenokarzinom	01/2008	2	3	1	0	unbekannt			09/09-03/10	5	0%	0		
69	40-60	Pankreaskarzinom duktales Adenokarzinom Ovarial-Ca. mucinöses Karzinom	09/2007 11/2008	3 U	2	1	1	unbekannt	Omentum	12/2008	12/09-02/10	4	0%	197	0	
71	<40	Zervix-Ca. (cervix uteri), neoadjuvant nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom	11/2009	3	2	1	0	unbekannt			11/09-11/09	3	0%	197	0	

A-5 Lebenslauf***Persönliche Daten:***

Name: Wagner
Vorname: Kathleen
Anschrift: Kulmstraße 1, 07318 Saalfeld
Telefon: 03671/528973
E-Mail: Kathleen.Wagner@med.uni-jena.de
Geburtsdatum: 13.09.1983
Geburtsort: Neuhaus am Rwg.
Familienstand ledig

Schulbildung:

09/1990-07/1994 Staatliche Grundschule Gräfenthal
08/1994-06/2002 Staatliches Gymnasium Neuhaus am Rennweg,
Fremdsprachen Englisch und Latein (Großes Latinum),
Abschluss: Abitur (Note: 1,0)

Hochschulbildung:

10/2002-01/2008 Studium an der Friedrich Schiller Universität im Fach
Biologie
Studienschwerpunkte: Mikrobiologie, Medizinische
Mikrobiologie, Pharmakologie und Ökologie
Titel der Diplomarbeit: Epigenetische Regulation der
Expression des Knochenmorphogenesefaktors (BMP-) 5
Abschluss Diplom-Biologin (Note: 1,1)
11/2007-03/2008 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am
Universitätsklinikum Jena (Klinik für Innere Medizin II,
Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie,
Onkologisches Forschungslabor)
Seit 03/2008 Promotion am Universitätsklinikum Jena (Klinik für Innere
Medizin II, Abteilung für Hämatologie und Internistische
Onkologie, Onkologisches Forschungslabor) zum Thema:
Charakterisierung von Tumor- und Tumor-assoziierten
Zellen aus dem peripheren Blut

Sonstiges: Karl-von-Frisch-Abiturientenpreis des Verbandes deutscher Biologen und biowissenschaftlicher Fachgesellschaften e.V. für herausragende Leistungen im Fach Biologie

Saalfeld, den 29.09.2011

A-6 KongressbeiträgePoster:

Wagner K, Feierfeil K, Sängner J, Schmidt A, Höffken K, Clement JH (2007)
Differential methylation patterns of the 5'-upstream region of the BMP5 gene in lung cancer.
11th STS Meeting 2007: Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes (01.-03. November 2007, Weimar)

Wagner K, Jörke C, Kroll TK, Höffken K, Clement JH (2009)
Isolation and enrichment of rare cells with an immunomagnetic cell selection system
Postgraduate-Symposium on Cancer Research (09. Mai 2009, Dornburg)

Grimm S, Wagner K, Bähring F, Friedrich KH, Pachmann K, Clement JH (2009)
Characterization of circulating tumor cells by single cell RT-PCR
Postgraduate-Symposium on Cancer Research (09. Mai 2009, Dornburg)

Wagner K, Jörke C, Kroll TK, Hochhaus A, Clement JH (2009)
Isolation and enrichment of circulating tumor cells and tumor-associated cells for single cell analysis
Advances in qPCR (17.-18. September 2009, Berlin)

Bähring F, Grimm S, Wagner K, Müller U, Hochhaus A, Clement JH (2009)
BMP-signalling in circulating epithelial cells
Advances in qPCR (17.-18. September 2009, Berlin)

Wagner K, Hochhaus A, Clement JH (2009)
Characterization of CD90-positive cells in the peripheral blood of tumor-patients
5th International Conference on Tumor Microenvironment: Progression, Therapy & Prevention (20.-24. Oktober 2009, Versailles, Frankreich)

Wagner K, Berndt A, Hochhaus A, Clement JH (2010)
CD90/Thy-1-positive cells in the peripheral blood of tumor patients co-express CD44
AACR 101st Annual Meeting 2010 (17.-21. April 2010, Washington, DC; USA)

Bähring F, Wagner K, Müller U, Kilper R, Hochhaus A, Clement JH (2010)
BMP-signalling in circulating epithelial tumor cells
14th STS Meeting 2010: Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes (18.-20. Oktober 2010, Weimar)

Wagner K, Voigt K, Sängner J, Schmidt A, Schneider CP, Hochhaus A, Clement JH (2010)
Expression and epigenetic regulation of the BMP5 gene in non-small cell lung cancer (NSCLC)
CLCGP conference Cancer Genomics and Clinical Care (15.-16. November, Köln)

Wagner K, Berndt A, Hochhaus A, Clement JH (2011)
 Selectively enriched CD90/Thy-1-positive cells from peripheral blood allow discrimination of patients and further analysis on a single cell level
 AACR 102nd Annual Meeting 2011 (02.-06. April 2011, Orlando, FL; USA)

Bähring F, Reber E, Müller U, Kilper R, Wagner K, Hochhaus A, Clement JH (2011)
 Circulating epithelial tumor cells are responsive to BMP-2
 AACR 102nd Annual Meeting 2011 (Orlando, FL; USA)

Vorträge:

Wagner K, Höffken K, Clement JH (2009)
 Characterization of CD90-positive cells in the peripheral blood of tumor-patients
 Postgraduate-Symposium on Cancer Research (09.Mai 2009, Dornburg)

Wagner K, Berndt A, Hochhaus A, Clement JH (2010)
 CD90 (Thy-1)-positive cells in the peripheral blood of tumor patients: Isolation and characterization
 2. Symposium Tumor Microenvironment: Bedeutung für Tumorbologie und Klinik
 (18.06.2010, Jena)

Wagner K (2010)
 Quantitative Analyse der Genexpression an isolierten Einzelzellen mittels qPCR (2010)
 Qiagen Rotorgene-Anwendertreffen (25.08.2010, Leipzig)

Wagner K, Berndt A, Hochhaus A, Clement JH (2010)
 CD44 is co-expressed in CD90/Thy-1-positive cells in the peripheral blood of breast cancer patients
 Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie (01.-05.10.2010, Berlin)

Wagner K, Berndt A, Hochhaus A, Clement JH (2011)
 Selectively enriched CD90/Thy-1-positive cells from peripheral blood of tumor patients
 3rd Postgraduate-Symposium on Cancer Research (30. April 2011, Dornburg)

A-7 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Dr. rer. biol. hum. Joachim Clement, KIM II, Abt. Hämatologie und Internistische Onkologie, Universitätsklinikum Jena und apl. Prof. Dr. Alexander Berndt, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Jena,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Saalfeld, den 29.09.2011

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

A-8 Danksagung

„Es ist ein lobenswerter Brauch: Wer was Gutes bekommt, der bedankt sich auch.“

Wilhelm Busch (1832-1908), dt. Schriftsteller, Maler u. Zeichner

Mein besonderer Dank gilt:

- ❖ Herrn Prof. Dr. A. Hochhaus und Herrn Prof. Dr. C. Liebmann für die Vergabe des Themas und die Übernahme der Gutachterfunktion
- ❖ Herrn Dr. J. H. Clement für die hervorragende fachliche Betreuung und Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas
- ❖ allen Mitwirkenden des IZKF-Forschungsverbundes „Tumorassoziierte Fibroblasten-Bedeutung für Invasion und Metastasierung“, besonders apl. Prof. Dr. Alexander Berndt und Mitarbeitern für die Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung der immunhistochemischen Analysen des Primärtumormaterials
- ❖ allen Mitarbeitern des Onkologischen Forschungslabors für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielseitige Unterstützung, besonders Cornelia Jörke, Bärbel Spies-Weißhart, Torsten Kroll und Jana Wotschadlo
- ❖ Franziska Bähring, Susanne Grimm und Isabel Taubert für die langjährige Freundschaft, anregende wissenschaftliche Diskussionen und die nötige moralische Unterstützung
- ❖ Holger Heerwagen für sein Verständnis und die einfühlsame Aufmunterung zur richtigen Zeit
- ❖ meinen Eltern Gabi und Heiner Wagner für die grenzenlose Unterstützung und den uneingeschränkten Glauben an mich